

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 522**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013 E 16166821 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3103872**

54 Título: **Oligonucleótidos para la realización de 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:
05.02.2019

73 Titular/es:

PROQR THERAPEUTICS II B.V. (100.0%)

Zernikedreef 9

2333 CK Leiden, NL

72 Inventor/es:

DE BOER, DANIEL ANTON y

RITSEMA, TITA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 698 522 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de la terapia genética, más específicamente a oligonucleótidos para la realización de un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva.

Antecedentes de la invención

- 10 Muchas enfermedades genéticas están causadas por mutaciones en el genoma. Se ha descubierto que varios tipos de modificaciones son mutaciones del genoma: delección de uno o varios pares de bases, una o varias faltas de coincidencia en la secuencia del gen, la inserción de uno o varios nucleótidos, o reiteración de tripletes repetidos y la ausencia o duplicación de una parte completa del gen.

Las enfermedades genéticas producidas por faltas de coincidencia, eliminaciones o inserciones de uno o varios pares de bases incluyen la fibrosis quística, distrofia muscular, anemia de células falciformes, hemofilia, β -talasemia, Síndrome de X frágil.

- 15 Se puede emplear la reparación de ARN para reparar defectos genéticos a nivel del ARN.

- Los oligonucleótidos y complejos de los mismos se han empleado como moléculas terapéuticas para reparar las modificaciones del 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 de ARN y/o ADN modificados. Se emplean para obtener la reparación específica del sitio de un ADN defectuoso. Se anticipaba que iba a producirse una reparación mediante la activación de mecanismos endógenos de reparación de ADN después del reconocimiento de la falta de coincidencia introducida.
- 20

- También se han empleado oligonucleótidos que forman tripletes como herramientas específicas de secuencia para el direccionamiento genético. Los oligonucleótidos que forman tripletes se unen en el surco mayor del ADN de doble cadena, con alta afinidad. Debido a esta característica se ha propuesto a los oligonucleótidos formadores de tripletes como herramientas para las correcciones específicas del sitio de genes direccionados (Knauer y col., Hum Mol Genet. (2001) 10, 2243-2251; Richardson y col., Drug Target (2002) 10, 133-134; Thoung y col., (1993) Angewandte Chemie. Intl. Ed. Eng., 32, 666-690.). Los procedimientos de reparación genética dirigida actuales no son muy eficaces, y/o no se ha demostrado que funcionen en células vivas *in situ*, dejando un espacio para otro mecanismo de reparación de defectos genéticos.
- 25
- 30

- Se ha informado de la reparación de genes defectuosos a nivel de ARN. La reparación específica de ARNm por un complejo de oligonucleótidos duplicados se empleó, por ejemplo, para insertar nucleótidos en el ARNm $\Delta F508$ CFTR *in vitro*. El mecanismo mediante el cual esto está mediado se ha postulado que es por degradación mediada por la RNasa H, seguido por la reparación de 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; documento WO2005094370, oligonucleotide complex compositions and methods of use as gene alteration tools).
- 35

- Ying Shen y col., Mutation Research (2011), 717(1-2):91-98 describe el uso de un oligonucleótido de ARN de cadena sencilla flanqueado por regiones de ADN como herramienta de alteración genética en células bacterianas y humanas.
- 40

Descripción de la invención

- La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a procedimientos para la reparación genética dirigida en células vivas, más preferentemente en células vivas de un organismo multicelular (*in vivo*). La invención se refiere más específicamente a hacer cambios en un ARN diana en las células vivas *in vivo* en organismo multicelulares, más particularmente en animales, más particularmente en mamíferos, incluso más específicamente en seres humanos. A pesar de los informes anteriores de reparación genética en células vivas, se cree que la presente invención que la presente invención desvela por primera vez la posibilidad de hacer cambios en una molécula de ARN diana en una célula viva *in vivo*, cambiando de esta manera el fenotipo de ese organismo, utilizando oligonucleótidos, preferentemente, oligonucleótidos de cadena sencilla, más preferentemente oligorribonucleótidos de cadena sencilla, incluso más específicamente oligorribonucleótidos de cadena sencilla modificados químicamente. Sorprendentemente, los oligonucleótidos de acuerdo con la invención se pueden administrar *in vivo* sin pérdida de actividad y en cantidades tales como para restaurar sustancialmente el fenotipo enfermo del organismo objeto. La invención se ilustra mediante la administración en el pulmón de un organismo que padece una fibrosis quística de un oligorribonucleótido modificado químicamente que es capaz de restaurar la secuencia de ARN que codifica la CFTR restaurando de esta manera la función de la proteína CFTR y restaurando
- 45
- 50
- 55

el fenotipo CF, a al menos mejorando la afección del organismo. Al introducir dicho oligonucleótido, preferentemente antisentido de cadena sencilla, en una célula, preferentemente una célula de mamífero, más preferentemente una célula humana, se dirige al ARN o un precursor o un armazón del mismo en el lugar donde el ARN necesita ser reparado y posiblemente actúa como una cadena guía para la reparación del ARN. El mecanismo específico de la reparación es desconocido, pero el oligonucleótido de acuerdo con la invención, una molécula de reparación de cadena sencilla preferentemente no permite la actuación de la RNasa H en el proceso de reparación. El cambio mediado en el ARN diana podría dirigirse a nivel de ARN o indirectamente por medio del ADN que se transcribe posteriormente en la molécula de ARN, o un precursor de la misma. Se hace referencia a los oligonucleótidos descritos en el presente documento como el oligonucleótido de acuerdo con la invención y se pueden utilizar en todas las realizaciones de la presente invención.

Todas las realizaciones de la presente invención se pueden utilizar, *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

La presente invención se puede utilizar convenientemente para el tratamiento de la fibrosis quística, preferentemente por reparación de la mutación deltaF508 en el exón 10 del CFTR (regulador de conductancia transmembrana en la fibrosis quística). El modo de acción de un oligonucleótido ejemplar de acuerdo con la invención, la molécula representada en la SEQ ID NO: 1, se representa en las figuras 1-3 y 7A. La actividad de un oligonucleótido ejemplar de acuerdo con la invención, la molécula representada en la SEQ ID NO: 1 en comparación con el dúplex descrito previamente (Zamecnik y col, supra), se ilustra en la Figura 4. La figura muestra que el oligonucleótido antisentido (AON) de cadena sencilla descrito actualmente está al menos tan activo como, y parece que más activo, en la reparación del CFTR en comparación con la molécula dúplex descrita anteriormente (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 como se describe en Zamecnik y col, supra, véase inter alia Figure 4 de la página 8153.

La presente invención también se puede utilizar convenientemente para hacer un cambio en otra molécula de ARN diana y/o el tratamiento de otras enfermedades relacionadas con trastornos (genéticos), tal como, pero sin limitarse a albinismo, deficiencia de alfa-1-antitripsina, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, asma, β-talasemia, síndrome de Cadasil, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), atrofia muscular espinal distal (DSMA), distrofia muscular de Duchenne/Becker, epidermolísis distrófica bullosa, epidermolísis bullosa, enfermedad de Fabry, Adenomatosis familiar, poliposis, galactosemia, enfermedad de Gaucher, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, hemofilia, Hematocromatosis hereditaria, síndrome de Hunter, enfermedad de Huntington, síndrome de Hurler, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), síndrome de poliaglutinación heredado, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Lynch, Marfan, mucopolisacaridosis, distrofia muscular, distrofia miotónica tipos I y II, enfermedad de Niemann-Pick tipo A, B y C, cáncer relacionado con NY-esol, enfermedad de Parkinson, síndrome de Peutz-Jeghers, Fenilcetonuria, enfermedad de Pompe, enfermedad ciliar primaria, hipertensión pulmonar, retinitis pigmentaria, enfermedad de Sandhoff, Síndrome de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), anemia de células falciformes, atrofia muscular espinal, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Tay-Sachs, e inmunodeficiencia ligada a X.

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 da lugar a la inserción de al menos una secuencia de aminoácido en una secuencia polipeptídica codificada por la secuencia de ARN diana. De acuerdo con una realización más preferida, la inserción de una secuencia de aminoácidos produce que se restaure el polipéptido codificado a un polipéptido que funciona normalmente en el organismo multicelular. En consecuencia, las realizaciones más preferidas de la invención son en las que la secuencia de ARN diana de un organismo multicelular se asocia con un trastorno producido por el mal funcionamiento de la secuencia de ARN diana y el trastorno genético se selecciona de entre el grupo de trastornos causados por secuencias de ARN diana que carecen de uno o más nucleótidos en comparación con las secuencias de ARN diana de funcionamiento normal. Se prefiere de acuerdo con la invención las secuencias ARN diana que carecen al menos de parte de un codón, que se restaura haciendo un cambio en la secuencia de ARN que utiliza un oligonucleótido de acuerdo con la invención.

La presente invención demuestra que se puede establecer la reparación de ARN *in vivo* con la administración sistémica de un oligonucleótido de acuerdo con la invención. Dependiendo del tejido u órgano implicado en el trastorno, o más generalmente en el que el cambio en un ARN diana se va a conseguir, el modo de administración se puede ajustar para optimizar el suministro del oligonucleótido de acuerdo con la invención. Para los trastornos en los pulmones y otras dolencias respiratorias, los oligonucleótidos de acuerdo con la invención se pueden administrar directamente a los pulmones, por ejemplo, mediante inhalación. De manera alternativa, dependiendo del trastorno y/o el tejido diana, la administración puede tener lugar por vía tópica (por ejemplo, en la piel) o sistémicamente, tal como por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, oral, rectal, intracraneal y similares.

Los oligonucleótidos que se utilizan en la invención contienen nucleótidos de ARN, más específicamente en los que todos los nucleósidos del oligonucleótido son 2'-O-alkil ribonucleósidos. El oligonucleótido de acuerdo con la invención puede comprender, por ejemplo, una inosina y/o puede comprender nucleótidos modificados,

preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en 2'-O-metil ribosa, fosforotioato, metilfosfonato, 5-metil-dC, 2-amino-dA, C5-pirimidina. Uno de dichos ejemplos preferido de un nucleótido estabilizado es un nucleótido modificado con 2'-O-metilo. Otras medidas para aumentar la estabilidad podrían ser, por ejemplo, enlaces fosforotioato entre los nucleótidos. Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención se pueden preparar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica. El experto en la técnica conoce cómo sintetizar los oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

En consecuencia, un oligonucleótido de acuerdo con la invención está modificado químicamente para que resista las endonucleasas, exonucleasas y la RNasa H, y para promover la unión (ARN) y la estabilidad del dúplex. La característica particular del químico escogido afecta, al menos en parte, al suministro de un oligonucleótido de acuerdo con la invención a la diana: vía de administración, bioestabilidad, biodistribución, distribución intra tisular, y captación y tráfico celular. Además, se puede aplicar una optimización a la química del oligonucleótido para aumentar la afinidad de unión y la estabilidad, aumentar la actividad, mejorar la seguridad, y/o reducir el coste de los artículos reduciendo la longitud o mejorando los procedimientos de síntesis y/o purificación. Están disponibles múltiples modificaciones químicas para los expertos en la técnica en general y/o comercialmente (tales como 2'-O-metil ARN y pirimidinas sustituidas en 5 y 2,6-diaminopurinas).

Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una modificación al menos en el armazón y/o al menos de una base.

Una modificación en una base incluye una versión modificada de las bases purínicas y pirimidínicas naturales (por ejemplo, adenina, uracilo, guanina, citosina, y timina), tal como hipoxantina, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiopirimidina (por ejemplo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina), G-clamp y sus derivados, pirimidinas sustituidas en 5 (por ejemplo, 5-halouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Super T), 7 deazaguanina, 7-deazaadenina, 2-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deazaadenina, 8-aza-7-deaza-2,6-diaminopurina, Super G, Super A, y N-4-etilcitosina, o derivados de los mismos; N²-ciclopentilguanina, (cPent-G), N²-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP), y N²-propil-2-aminopurina (Pr-AP), o derivados de los mismos; y bases degeneradas o universales, como 2,6-difluorotolueno o bases ausentes tales como sitios abásicos (por ejemplo, 1-desoxirribosa, 1-desoxi-2-O-metilribosa; o derivados de la pirrolidina en los que el anillo de oxígeno se ha sustituido con nitrógeno (azarribosa). Ejemplos de derivados de Super A, Super G y Super T se pueden encontrar en la Patente de EE. UU. 6.683.173 (Epoch Bio-sciences). Se demostró que cPent-G, cPent-AP y Pr-AP reducían los efectos inmunoestimulantes cuando se incorporaban en un ARNip (Peacock H. y col. J. Am. Chem. Soc. 2011,133, 9200).

La modificación de un azúcar incluye una versión modificada 2'-O-alquil del resto ribosilo, por ejemplo, 2'-O-metil, 2'-O-(2-cianoetil), 2'-O-(2-metoxi)etil (2'-MOE), 2'-O-(2-tiometil)etil, 2'-O-butil, 2'-O-propargil, 2'-O-alil, 2'-O-(2-amino)propil, 2'-O-(2-(dimetilamino) propil), 2'-O-(2-amino) etil, 2'-O-(2-(dimetilamino) etil); 2'-desoxi (DNA); 2'-O-(haloalcoxi) metil (Arai K. y col. Bioorg. Med. Chem. 2011, 21, 6285), por ejemplo, 2'-O-(2-cloroetoxi) metil (MCEM), 2'-O-(2,2-dicloroetoxi) metil (DCEM); 2'-O-alcoxycarbonil, por ejemplo, 2'-O-[2-(metoxycarbonil)etil] (MOCE), 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil) etil] (MCE), 2'-O-[2-(N,N-dimetilcarbamoil) etil] (DCME); 2'-halo, por ejemplo, 2'-F, ácido nucleico FANA (2'-F arabinosil).

Una modificación en el armazón incluye una versión modificada del fosfodiéster, tal como fosforotioato (PS), fosforotioato quiralmente puro, fosforoditioato (PS2), fosfonoacetato (PACE), fosfonoacetamida (PACA), tiofosfonoacetato, tiofosfonoacetamida, fosforotioato en profármaco, fosfonato H, metil fosfonato, metilfosfonotioato, metil fosfato, metilfosforotioato, etilfosfato, etil fosforotioato metil fosfonotioato, metil fosfato, metil fosforotioato, etil fosfato, etil fosforotioato, borano fosfato, boranofosforotioato, metil boranofosfato, metil boranofosforotioato, metil boranofosfonato, metil borano fosfonotioato, y sus derivados. Otra modificación incluye fosforamidita, fosforoamidato, N3'→P5' fosforoamidato, fosforodiamidato, fosforotiodiamidato, sulfamato, dimetilsulfóxido, sulfonato, triazol, oxalil, carbamato, metilenimino (MMI), y ácido nucleico tioacetamido (TANA); y sus derivados. También está englobada por la invención la introducción de más de una modificación distintas en el armazón en un oligonucleótido de acuerdo con la invención.

Otras modificaciones químicas de un oligonucleótido incluyen un ácido nucleico de base peptídica (PNA), PNA modificado con un agrupamiento de boro, y sus derivados.

Un oligonucleótido de acuerdo con la invención contiene una secuencia complementaria con el ARN diana que se va a reparar y preferentemente codifica una secuencia polipeptídica de tipo silvestre. En consecuencia, debido a la degeneración de codones, el oligonucleótido puede comprender uno o más codines complementarios degenerados. Los nucleótidos complementarios pueden estar presentes en cada lado del sitio que se va a reparar, es decir la secuencia que flanquea la secuencia que se va a alterar está preferentemente en el lado 3', 5' o 3' y 5' de la secuencia que se va a alterar. Con el emparejamiento de bases de estas secuencias complementarias se activa la reparación del ARN.

La secuencia de ARN diana se diferencia de la secuencia reparada o de tipo silvestre. El ARN diana no reparado es preferentemente una secuencia mutada. Preferentemente, la mutación es una sustitución, delección o inserción de una secuencia de tipo silvestre normal. El ARN reparado direccionado es una secuencia de tipo silvestre de un gen.

Un oligonucleótido de acuerdo con la invención preferentemente tiene una longitud de 15 a 100 nucleótidos y tiene preferentemente al menos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o al menos 40 nucleótidos de longitud, de los cuales al menos 10 son complementarios a la secuencia de ARN diana. Se pueden utilizar algunos nucleótidos distintos como armazón (o inductor) de la reparación. El emparejamiento de bases con la secuencia de ARNm diana se produce preferentemente en la célula. La célula puede ser una célula de mamífero y puede estar presente en un cultivo celular (*in vitro*) o en dentro de un cuerpo (*in vivo*).

La presente invención se refiere preferentemente a un procedimiento para el tratamiento de la fibrosis quística, en el que el trastorno genético es preferentemente la mutación delta F508 y la secuencia que se va a alterar es preferentemente el (pre-) ARNm del CFTR que alberga la mutación delta F508. La presente invención se utiliza preferentemente para reparar el ARN de pacientes de fibrosis quística con la mutación $\Delta F508$ en el regulador de conductancia transmembrana (CFTR). La introducción de 5'-UUU-3' o 5'-CUU-3' en lugar de los tres nucleótidos eliminados dará como resultado un ARN reparado que restaura el aminoácido fenilalanina perdido (F o Phe) en la secuencia proteica y de esta manera resulta en la formación de una proteína de tipo silvestre.

El ARN de CFTR con $\Delta F508$ se puede reparar, por ejemplo, poniendo en contacto y/o transfectando las células, preferentemente, células de mamífero, más preferentemente células humanas, *in vitro* o *in vivo* con un oligonucleótido de acuerdo con la invención.

Un oligonucleótido preferido de acuerdo con la invención es complementario con una secuencia que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con los nucleótidos 16-30 y 34-48 de la SEQ ID NO: 6 y la secuencia alterada se selecciona preferentemente de entre 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3', preferentemente 5'-CUU-3'. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención más preferido es un oligonucleótido que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, preferentemente la SEQ ID NO: 1; o un oligonucleótido que comprende o consiste en una variante acortada de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, preferentemente la SEQ ID NO: 1. En dicha variante acortada se han eliminado algunos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nucleótidos desde el extremo 3' y/o 5' de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. Una variante preferida del oligonucleótido de acuerdo con la invención comprende los nucleótidos 7 a 29 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, preferentemente la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1; 5'-AUCAUAGGAAACACCAAAGAUGAUUUUUCUUU-3' (los nucleótidos CAPS son preferentemente ARN modificado 2'-O-Me).

SEQ ID NO: 3; 5'-AUCAUAGGAAACACCAAAAUGAUUUUUCUUU-3' (los nucleótidos CAPS son preferentemente ARN modificado 2'-O-Me).

Un oligonucleótido de acuerdo con la invención preferido adicionalmente incluye un oligonucleótido que comprende o consiste en un oligonucleótido con una secuencia seleccionada de entre el grupo de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24, o un oligonucleótido que comprende o consiste en una variante acortada de un oligonucleótido con una secuencia seleccionada de entre el grupo de las SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24. En dicha variante acortada se han retirado algunos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nucleótidos del extremo 3' y/o 5' de la SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24. Dichos oligonucleótidos se pueden utilizar convenientemente para hacer un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana, por ejemplo, por la inserción de un cambio de fase de 1 o 2 pares de bases en el codón eliminado de la fenilalanina (con fines de ilustración), una inserción en fase de un triplete de nucleósidos que crea un codón para la fenilalanina en la posición de aminoácidos 508 de la proteína CFTR, una inserción en fase de un triplete de nucleósidos que crea un codón para la leucina en la posición de aminoácido 508 u otra posición de aminoácido de la proteína CFTR, o por la inserción de un codón de parada en la secuencia codificante de CFTR. El modo de acción de estos oligonucleótidos ejemplares de acuerdo con la invención, las moléculas representadas en las SEQ ID NO: 16 a 24, se representan en las Figuras 7B-8F.

Preferentemente, en un oligonucleótido de acuerdo con la invención, algunos, es decir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos comprenden una modificación como se ha descrito previamente en el presente documento, o combinaciones de los mismos, preferentemente los nucleótidos están modificados con 2'-O-Me. Se pueden añadir otras características de aumento de la estabilidad, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, a las secuencias, tales como enlaces fosforotioato entre algunos o todos los nucleótidos. Todas o algunas de las modificaciones descritas se podrían combinar en una molécula antisentido.

Las modificaciones descritas anteriormente pueden aumentar la captación por las células epiteliales. De manera alternativa la molécula se puede acortar retando algunos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nucleótidos del extremo 3' y/o 5' para aumentar la captación por las células.

Para la aplicación *in vivo*, un oligonucleótido de acuerdo con la invención se puede empaquetar para el suministro (administración) en un liposoma, polisoma o nanopartículas u otra partícula adecuada tal como una partícula vírica. De manera alternativa, o en combinación con los vehículos de suministro, las moléculas de reparación pueden formar complejos con polietilenimina (PEI) y/o polietilenglicol (PEG). Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención se pueden sintetizar dentro de la célula, incluso *in vivo*, por ejemplo, infectando las células con un virus o una partícula tipo virus que codifique el oligonucleótido. De manera alternativa, las células vivas se pueden

transfectar – *in vitro* o *in vivo* – con un ADN (vírico) o plásmido o similares. Al infectarse o transfectarse las células vivas, el oligonucleótido de acuerdo con la invención se sintetiza dentro de la célula viva mediante una transcripción y/o replicación normales.

5 En consecuencia, un oligonucleótido de acuerdo con la invención se puede suministrar como tal, directamente en la célula, tejido u órgano de un organismo multicelular. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención también se puede administrar indirectamente utilizando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede proporcionarse a una célula, tejido u órgano de un organismo multicelular, por ejemplo, en forma de un vector o un vector de expresión, en el que el vector o vector de expresión comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el oligonucleótido. El vector de expresión se introduce preferentemente en una célula, tejido, órgano de un organismo multicelular mediante un vehículo de suministro genético. En una realización, se proporciona un vector vírico que comprende un casete de expresión o un casete de transcripción que dirige la expresión o transcripción del oligonucleótido de la invención. Un vehículo de suministro preferido es un vector vírico tal como un vector de un virus adeno-asociado (AVV), o un vector retrovírico tal como un vector de lentivirus y similares.

15 Una realización de la invención se refiere al uso de un vector que comprende una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente, en el que el vector es un vector adecuado para la terapia genética. los vectores que son adecuados para la terapia genética se describen en Anderson 1998, Nature 392: 25-30; Walther y Stein, 2000, Drugs 60: 249-71; Kay y col, 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 y col, 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 las referencias citadas en ellos.

20 Un vector para terapia genética particularmente adecuado incluye un vector adenovírico o virus adeno-asociado (AVV). Estos vectores infectan un amplio número de tipos celulares en división y no división. Además, los vectores adenovíricos son capaces de altos niveles de expresión transgénica. Sin embargo, debido a la naturaleza episómica de los vectores adenovírico y AAV después de la entrada en la célula, estos vectores víricos son más adecuados para aplicaciones terapéuticas que necesitan solamente la expresión transitoria del transgén (Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-2604; Goncalves, 2005, Virol J. 2(1):43) como se ha indicado anteriormente. Los vectores adenovíricos preferidos se modifican para reducir la respuesta del huésped como revisó Russel (2000, supra).

25 Un vector retrovírico preferido para la aplicación en la presente invención es una construcción de expresión basada en lentivirus. Los vectores lentivíricos tienen la única capacidad para infectar células que no se dividen (Amado y Chen, 1999 Science 285: 674-6). Los procedimientos para la construcción y uso de construcciones de expresión basadas en lentivirus se describen en las Patentes de EE. UU. N.º 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 y col. (2000, J Gene Med 2000; 2: 308-16).

30 En general, los vectores de terapia genética se considerarán vectores de expresión descritos anteriormente en el sentido de que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica el oligonucleótido de acuerdo con la invención que se va a expresar, por lo que dicha molécula de ácido nucleico está unida operativamente a secuencias reguladoras apropiadas. Dicha secuencia reguladora comprenderá al menos una secuencia promotora. Los promotores adecuados para la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido a partir de vectores de terapia genética incluyen, por ejemplo, el promotor temprano intermedio de citomegalovirus (CMV), los promotores de repetición terminal largo vírico (LTR), tal como los del virus de leucemia murina de Moloney (MMLV), promotor temprano del virus de sarcoma de Rous, o HTLV-1, el virus 40 de simio (SV40) y el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple.

35 Se pueden aplicar muchas medicinas para alcanzar el pulmón mediante las vías aéreas. Una de dichas medicinas podría consistir en la molécula de reparación de ARN, es decir, el oligonucleótido de acuerdo con la invención. Se utiliza preferentemente un nebulizador para el suministro del oligonucleótido de acuerdo con la invención en un aerosol en las células epiteliales de las vías aéreas. De manera alternativa, se podría utilizar una formulación de inhalación de polvo seco. El uso de oligonucleótidos de cadena sencilla de acuerdo con la invención en un sistema de suministro en las vías aéreas reduce las posibilidades de desintegración de la molécula por fuerzas de cizalladura durante la administración.

40 En muchos casos, la capa de mucus presenta un aumento de grosor, dando lugar a una disminución de la absorción de medicinas por vía pulmonar. Una de dichas enfermedades es la bronquitis crónica, otro ejemplo es la fibrosis quística. Están disponibles distintas formas de normalizadores del mucus, tal como DNAsas, solución salina hipertónica o manitol, que están disponibles en el mercado con el nombre de Bronchitol. Cuando se utilizan normalizadores del mucus en combinación con los compuestos de reparación del ARN, tales como los oligonucleótidos de acuerdo con la invención, pueden aumentar la eficacia de las medicinas. En consecuencia, la administración de un oligonucleótido de acuerdo con la invención a un sujeto, preferentemente un sujeto humano se combina preferentemente con normalizadores de mucus, preferentemente, los normalizadores de mucus descritos en el presente documento. Además, la administración de los nucleótidos de acuerdo con la invención se puede combinar con la administración de una molécula pequeña para el tratamiento de la CF, tal como compuestos potenciadores, por ejemplo, Kalydeco (ivacaftor; VX-770), o compuestos correctores, por ejemplo, VX-809

(Lumacaftor) y/o VX-661.

De manera alternativa, o en combinación con los normalizadores del mucus, se puede aplicar el suministro en partículas o nanopartículas de penetración en el mucus para un suministro eficaz de las moléculas de reparación de ARN a las células epiteliales, por ejemplo, del pulmón y el intestino. En consecuencia, la administración de un oligonucleótido de acuerdo con la invención a un sujeto, preferentemente un sujeto humano, preferentemente utiliza el suministro en partículas o nanopartículas de penetración en el mucus.

A menudo están presentes infecciones pulmonares crónicas y agudas en los pacientes con enfermedades tales como la fibrosis quística. Los tratamientos con antibiótico reducen las infecciones bacterianas y los síntomas de estas tales como el engrosamiento del mucus y/o la formación de una biopelícula. El uso de antibióticos en combinación con moléculas de reparación de ARN podría aumentar la eficacia de la reparación de ARN debido al acceso más fácil a las células diana para la molécula de reparación. En consecuencia, la administración de un oligonucleótido de acuerdo con la invención a un sujeto, preferentemente un sujeto humano, se combina preferentemente con un tratamiento antibiótico para reducir infecciones bacterianas y los síntomas de estos tales como engrosamiento del mucus y/o formación de una biopelícula. Los antibióticos se pueden administrar por vía sistémica o local o ambas.

Para la aplicación, por ejemplo, en pacientes con fibrosis quística los oligonucleótidos de acuerdo con la invención, o los oligonucleótidos de acuerdo con la invención empaquetados o formando un complejo se pueden combinar con cualquier normalizador del mucus tal como DNasa, manitol, solución salina hipertónica y/o antibióticos y/o una molécula pequeña para el tratamiento de CF, tal como compuestos potenciadores, por ejemplo, Kalydeco (ivacaftor; VX-770), o compuestos correctores, por ejemplo, VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.

Para aumentar el acceso a las células diana, se podría aplicar un lavado bronquio-alveolar (BAL) para limpiar los pulmones antes de la administración de los oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

Se puede utilizar una cápsula de liberación en el tiempo para el suministro de los oligonucleótidos de acuerdo con la invención a las células epiteliales intestinales. La reparación del CFTR en estas células puede aumentar la captación de nutrientes. Esto se podría combinar con el uso de preparaciones de enzimas pancreáticas de origen biológico o sintético, tal como pancrelipase o Creon que están disponibles en el mercado y se utilizan en general por los pacientes de CF para ayudar a la digestión.

En todas las realizaciones de la presente invención, el oligonucleótido de acuerdo con la invención puede estar presente en una composición de solución salina hipertónica, es decir, una composición que comprende un oligonucleótido de acuerdo con la invención y adicionalmente comprende un 2 % - 9 % de solución salina, preferentemente un 3 % - 8 % de solución salina, más preferentemente un 4 % - 8 % de solución salina, más preferentemente un 5 % - 8 % de solución salina, más preferentemente un 6 % - 8 % de solución salina (tal como un 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 % o 8,0 %), más preferentemente un 6 % - 7 % de solución salina, más preferentemente aun aproximadamente un 7 % de solución salina, más preferentemente un 7 % de solución salina. El porcentaje de solución salina del presente documento se define como el peso de solución salina / volumen total de la composición, es decir, un 7 % de solución salina se corresponde con 70 gramos de salino / litro de composición. La solución salina hipertónica es preferentemente de manera esencial una solución de NaCl.

En cualquier realización de la presente invención, el oligonucleótido y/o composición de acuerdo con la invención se puede administrar de acuerdo con cualquier manera conocida por el experto en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, la administración al pulmón, preferentemente mediante las vías aéreas, y la administración sistémica, preferentemente la administración intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea.

El experto en la técnica comprenderá que los procedimientos de suministro, vehículos y combinaciones de administración descritos anteriormente en el presente documento, se puede combinar adicionalmente de acuerdo con la presente invención, por ejemplo un oligonucleótido de acuerdo con la invención, por ejemplo, un oligonucleótido de acuerdo con la invención y/o una composición que comprende dicho oligonucleótido puede formar un complejo con un compuesto de suministro como se describe en el presente documento, puede empaquetarse en un vehículo de suministro descrito en el presente documento y/o puede empaquetarse en una cápsula de liberación en el tiempo.

Un procedimiento de suministro preferido está en forma de una partícula vírica o una secuencia de ácido nucleico vírico que codifica un oligonucleótido de acuerdo con la invención, cuyo oligonucleótido se expresa al infectarse una célula viva con la partícula vírica o la transfección de la célula viva con una secuencia de ácido nucleico vírico; preferentemente como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

El suministro de un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede ser al pulmón preferentemente mediante las vías aéreas y/o el intestino. La administración se puede combinar con normalizadores del mucus preferentemente como se describe en el presente documento y/o con tratamiento antibiótico preferentemente como se describe en el presente documento y/o se puede combinar con la administración de preparaciones enzimáticas pancreáticas preferentemente como se describe en el presente documento y/o se puede combinar con un lavado bronco-alveolar

para aumentar el acceso a las células diana.

5 El experto en la técnica comprenderá que se pueden combinar dos o más oligonucleótidos de acuerdo con la invención. El experto en la técnica comprenderá que cuando se hace referencia en el presente documento a un oligonucleótido de acuerdo con la invención, preferentemente se puede utilizar una composición o composición farmacéutica de acuerdo con la invención de manera intercambiable en los procedimientos y usos de acuerdo con la invención.

10 En un aspecto, se desvela en el presente documento el uso de un oligonucleótido para hacer un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva, que comprende la etapa de proporcionar el oligonucleótido a la célula viva en condiciones que permitan a la célula viva de dicho oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria de la molécula de ARN diana, de manera que la hibridación del oligonucleótido del ARN diana, o un precursor del mismo, o un armazón del mismo, tiene lugar en dicha célula viva, permitiendo a la maquinaria bioquímica presente en dicha célula viva copiar una diferencia de secuencia del oligonucleótido con respecto a la secuencia de la molécula de ARN diana en la molécula de ARN, sea directamente o mediante un precursor del mismo o un armazón del mismo, de manera que haga el cambio en la secuencia de dicho ARN diana.

15 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido es un oligonucleótido como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido es un oligorribonucleótido.

20 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se proporciona a la célula viva en una forma de cadena sencilla.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la célula viva es parte de un organismo multicelular.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la célula viva es una célula animal, más preferentemente una célula humana.

25 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en la secuencia del ARN diana produce que la célula altere su fenotipo.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en dicho ARN diana se confirma determinando la secuencia de dicho ARN diana, o un precursor del mismo o un armazón del mismo.

30 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en dicho ARN diana se confirma determinando la secuencia de un producto polipeptídico o de una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido codificado por dicho ARN diana.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en dicho ARN diana se confirma determinando la secuencia un cambio fenotípico en dicha célula viva, o el organismo que comprende dicha célula.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio es una mejora de un trastorno relacionado causalmente con la secuencia de un ARN diana antes del cambio.

35 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el trastorno es un trastorno genético.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido de este aspecto tiene una longitud de 15-100 nucleótidos. Más preferentemente, la longitud del oligonucleótido está entre 20 y 50, más presentemente entre 25 y 45 nucleótidos, más preferentemente entre 27 y 35 nucleótidos.

40 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido comprende una inosina y/o comprende nucleótidos modificados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en una 2'-O alquil ribosa, 2' fluoro ribosa, PMO, 5-metil-dC, 2-amino-dA, C5-pirimidina y/o enlaces entre nucleósidos modificados seleccionados de entre el grupo que consiste en enlaces de fosforotioato, enlaces metilfosfonato.

En las realizaciones de este aspecto, todos los nucleósidos del oligonucleótido son 2'-O alquil ribosa nucleósidos, más preferentemente, 2'-O metil ribosa nucleósidos.

45 En las realizaciones de este aspecto, todos los nucleósidos son ribonucleósidos.

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

50 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el ARN diana codifica el CFTR humano y el cambio resulta en la creación o restauración de un triplete de nucleósidos que codifican la fenilalanina en la posición de aminoácido 508 de la proteína CFTR.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio comprende la inserción de un triplete de nucleósidos seleccionado de entre el grupo que consiste en 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3'.

5 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido es complementario de una secuencia que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % de 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 entre el grupo que consiste en 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3'.

10 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido comprende o consiste en los nucleótidos 7-29, preferentemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o de SEQ ID NO: 3, preferentemente de la SEQ ID NO: 1. Otros oligonucleótidos incluyen un oligonucleótido que comprende o consiste en un oligonucleótido con una secuencia seleccionada de entre el grupo de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24, o un oligonucleótido que comprende o consiste en una variante acortada de un oligonucleótido con una secuencia seleccionada de entre el grupo de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24. En dicha variante acortada se han eliminado algunos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nucleótidos del extremo 3' y/o 5' de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24.

15 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se proporciona en un vehículo, preferentemente un liposoma, polisoma, o nanopartícula y/o en el que el oligonucleótido está formando un complejo con un compuesto de suministro, preferentemente polietilenimina (PEI) o polietilenglicol (PEG), y/o está unido a un esteroide, preferentemente el colesterol.

20 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se proporciona al pulmón, preferentemente mediante las vías aéreas, en una formulación seca o en un aerosol preferentemente utilizando un nebulizador, y preferentemente el oligonucleótido se proporciona junto con un mediador de transfección y/o una medicina para la fibrosis quística conocidos por el experto en la técnica, preferentemente una DNasa, manitol (preferentemente Bronchitol) y/o una molécula pequeña para el tratamiento de la CF, preferentemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.

25 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se proporciona en una solución salina hipertónica, preferentemente de entre un 2 % - 9 % de concentración salina, preferentemente un 3 % - 8 %, más preferentemente un 4 % - 8 %, más preferentemente un 5 % - 8 %, más preferentemente un 6 % - 8 %, más preferentemente un 6 % - 7 %, más preferentemente aun aproximadamente un 7 % de concentración salina, en el que la solución salina hipertónica es preferentemente una solución fisiológica y farmacéuticamente aceptable.

30 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la solución salina hipertónica es esencialmente una solución de NaCl.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se administra en una partícula de penetración en el mucus, preferentemente una nanopartícula de penetración en el mucus.

35 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la administración del oligonucleótido se combina con un tratamiento de antibiótico para reducir las infecciones bacterianas y los síntomas de estas tales como el engrosamiento del mucus y/o la formación de biopelículas.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, se aplica un lavado broncoalveolar (BAL) antes de la administración del oligonucleótido de acuerdo con la invención.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se administra en una cápsula de liberación en el tiempo para facilitar el suministro a las células intestinales.

40 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la administración del oligonucleótido se combina con la administración de una composición de enzimas pancreáticas biológica o sintética tal como pancrelipase o Creon.

45 En un aspecto adicional, se desvela en el presente documento un oligonucleótido para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal, en el que dicho oligonucleótido es capaz de hacer un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva de dicho cuerpo humano o animal, proporcionando el oligonucleótido a la célula viva en condiciones que permitan la captación de dicho oligonucleótido por la célula viva, en el que dicho oligonucleótido comprende una secuencia que es al menos complementaria de la molécula de AR, de manera que la hibridación del oligonucleótido del ARN diana, o un precursor del mismo, o un armazón del mismo, tiene lugar en dicha célula viva, permitiendo que la maquinaria bioquímica presente en dicha célula viva copie una diferencia de secuencia del oligonucleótido con respecto a la molécula de ARN diana en la molécula de ARN diana, sea directamente o mediante un precursor del mismo o un armazón del mismo, de manera que tenga el cambio en dicho ARN diana.

50 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido es un oligonucleótido como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido es un oligorribonucleótido.

- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en la secuencia del ARN diana produce que la célula altere su fenotipo.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en la secuencia de dicho ARN diana se confirma determinando la secuencia de dicho ARN diana, o un precursor del mismo o un almacén del mismo.
- 5 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en la secuencia de dicho ARN diana se confirma determinando la secuencia de un producto polipeptídico codificado por dicho ARN diana.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en la secuencia de dicho ARN diana se confirma determinando un cambio de fenotipo en dicha célula viva, o el organismo que comprende dicha célula.
- 10 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio fenotípico es una mejora de un trastorno relacionado causalmente con la secuencia del ARN diana antes del cambio.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el trastorno es un trastorno genético.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido tiene una longitud de 15-100 nucleótidos.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la longitud del oligonucleótido está entre 20 y 50, más preferentemente entre 25 y 45 nucleótidos, más preferentemente entre 27 y 35 nucleótidos.
- 15 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligorribonucleótido comprende una inosina y/o comprende nucleótidos modificados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en una 2'-0 alquil ribosa, 2' fluoro ribosa, PMO, 5-metil-dC, 2-amino-dA, C5-pirimidina y/o enlaces entre nucleósidos modificados seleccionados de entre el grupo que consiste en enlaces de fosforotioato, enlaces metilfosfonato.
- 20 En las realizaciones de este aspecto, todos los nucleósidos del oligonucleótido son nucleósidos con 2'-0 alquil ribosa, más preferentemente, nucleósidos con 2'-0 metil ribosa.
- En las realizaciones de este aspecto, todos los nucleósidos son ribonucleósidos.
- En todas las realizaciones de acuerdo con la invención, los oligonucleótidos de acuerdo con la invención se administran normalmente en dosis que varían de 1 mg a 1000 mg, más preferentemente de 10 mg a 100 mg, aún más preferentemente de 100 mg a 10 mg, y más preferentemente de 500 mg a 5 mg, dependiendo de la célula (tejido) que se va a tratar, el peso del organismo, el modo y/o sitio de la administración (local vs sistémica), el sitio de administración (intraperitoneal, intramuscular, pulmonar, etc.), el trastorno que se va a tratar, el régimen que se va a aplicar (embolada única o repetida o dosificación continua) y similares. Una persona habituada en la técnica será capaz de establecer la dosis óptima utilizando el ensayo y error.
- 25 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio de secuencia de la molécula de ARN diana comprende una inserción o una sustitución de uno o más nucleósidos.
- 30 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el ARN diana codifica el CFTR humano y el cambio resulta en la creación o restauración de un triplete de nucleósidos que codifica la fenilalanina en la posición de aminoácido 508 de la proteína CFTR.
- 35 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio comprende la inserción de un triplete de nucleósidos seleccionado de entre el grupo que consiste en 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3'.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido es complementario de una secuencia que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % de 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 entre el grupo que consiste en 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3'.
- 40 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido comprende o consiste en los nucleótidos 7-29, preferentemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o de SEQ ID NO: 3, preferentemente de la SEQ ID NO: 1. Otros oligonucleótidos preferidos incluyen un oligonucleótido que comprende o consiste en un oligonucleótido con una secuencia seleccionada de entre el grupo de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24, o un oligonucleótido que comprende o consiste en una variante acortada de un oligonucleótido con una secuencia seleccionada de entre el grupo de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24. En dicha variante acortada se han eliminado algunos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nucleótidos del extremo 3' y/o 5' de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24.
- 45 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se proporciona en un vehículo, preferentemente un liposoma, polisoma, o nanopartícula y/o en el que el oligonucleótido está formando un complejo con un compuesto de suministro, preferentemente polietiliminina (PEI) o polietilenglicol (PEG), y/o está unido a un esteroide, preferentemente el colesterol.
- 50 Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se proporciona al pulmón, preferentemente

- mediante las vías aéreas, en una formulación seca o en un aerosol preferentemente utilizando un nebulizador, y preferentemente el oligonucleótido se proporciona junto con un mediador de transfección y/o una medicina para la fibrosis quística conocidos por el experto en la técnica, preferentemente una DNasa, manitol (preferentemente Bronchitol) y/o una molécula pequeña para el tratamiento de la CF, preferentemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.
- 5
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se proporciona en una composición salina hipertónica, preferentemente de entre un 2 % - 9 % de concentración salina, preferentemente un 3 % - 8 %, más preferentemente un 4 % - 8 %, más preferentemente un 5 % - 8 %, más preferentemente un 6 % - 8 %, más preferentemente un 6 % - 7 %, más preferentemente aun aproximadamente un 7 % de concentración salina, en el que la solución salina hipertónica es preferentemente una solución fisiológica y farmacéuticamente aceptable.
- 10
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la solución salina hipertónica es esencialmente una solución de NaCl.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se administra en una partícula de penetración en el mucus, preferentemente una nanopartícula de penetración en el mucus.
- 15
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la administración del oligonucleótido se combina con un tratamiento de antibiótico para reducir las infecciones bacterianas y los síntomas de estas tales como el engrosamiento del mucus y/o la formación de biopelículas.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, se aplica un lavado broncoalveolar (BAL) antes de la administración del oligonucleótido de acuerdo con la invención.
- 20
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se administra en una cápsula de liberación en el tiempo para facilitar el suministro a las células intestinales.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la administración del oligonucleótido se combina con la administración de una composición de enzimas pancreáticas biológicas o sintéticas tal como pancrelipase o Creon.
- 25
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido como se define en el aspecto previo de la presente invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o una solución salina hipertónica fisiológica y farmacéuticamente aceptable, preferentemente de entre un 2 % - 9 % de concentración salina, preferentemente un 3 % - 8 %, más preferentemente un 4 % - 8 %, más preferentemente un 5 % - 8 %, más preferentemente un 6 % - 8 %, más preferentemente un 6 % - 7 %, más preferentemente aun aproximadamente un 7 % de concentración salina.
- 30
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la solución salina hipertónica es esencialmente una solución de NaCl.
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un mediador de la transfección.
- 35
- Preferentemente, en las realizaciones de este aspecto, la composición farmacéutica comprende adicionalmente una medicina para la fibrosis quística conocida por el experto en la técnica, preferentemente una DNasa, manitol y/o una molécula pequeña para el tratamiento de la CF, preferentemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.
- 40
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un oligonucleótido de acuerdo con la invención y/o una composición farmacéutica que comprende dicho oligonucleótido. Dicho oligonucleótido o composición de acuerdo con la invención es un oligorribonucleótido de cadena sencilla o una composición que comprende un oligorribonucleótido de cadena sencilla que es complementaria de una secuencia que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con los nucleótidos 16-30 y 34-48 de la SEQ ID NO: 6. Más preferentemente, dicho oligonucleótido o composición de acuerdo con la invención es un oligorribonucleótido de cadena sencilla o una composición farmacéutica que comprende un oligorribonucleótido de cadena sencilla que comprende los nucleótidos 7-29, preferentemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o de SEQ ID NO: 3, preferentemente de la SEQ ID NO: 1. Otros oligonucleótidos preferidos incluyen un oligonucleótido que comprende o consiste en un oligonucleótido con una secuencia seleccionada de entre el grupo de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24, o un oligonucleótido que comprende o consiste en una variante acortada de un oligonucleótido con una secuencia seleccionada de entre el grupo de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24. En dicha variante acortada se han eliminado algunos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nucleótidos del extremo 3' y/o 5' de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 24.
- 45
- 50
- 55
- En todas las realizaciones de la presente invención, se puede utilizar un excipiente que ayudará (adicionalmente) al aumento de la estabilidad, solubilidad, absorción, biodisponibilidad, actividad, farmacocinética, farmacodinámica y suministro de un oligonucleótido de acuerdo con la invención a una célula y en la célula, en particular los excipientes capaces de formar complejos, vesículas, nanopartículas, micropartículas, nanotubos, nanogeles, hidrogeles,

poloxámeros o plurónicos, polimersomas, coloides, microburbujas, vesículas, micelas, lipoplejos y/o liposomas, que suministren el compuesto, sustancias y/u oligonucleótidos que formen un complejo o estén atrapados en las vesículas o liposomas a través de una membrana celular. Ejemplos de nanopartículas incluyen nanopartículas de oro, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de sílice, nanopartículas lipídicas, partículas de azúcar, nanopartículas proteicas y nanopartículas peptídicas. Otro grupo de nanopartículas son las nanopartículas poliméricas. Muchas de estas sustancias poliméricas se conocen en la técnica. Las sustancias adecuadas comprende, por ejemplo, polietilénimina (PEI), ExGen 500, polipropilénimina (PPI), poli(2-hidroxipropilénimina (pHP)), derivados del dextrano (por ejemplo, policationes tales como dietil amino etil amino etil (DEAE)-dextrano, que se conocen bien como reactivos de transfección de ADN se pueden combinar con butilcianoacrilato (PBCA) y hexilcianoacrilato (PHCA) para formular nanopartículas catiónicas que pueden suministrar dicho compuesto a través de las membranas celulares en las células), butilcianoacrilato (PBCA), hexilcianoacrilato (PHCA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poliaminas (por ejemplo, espermina, espermidina, putrescina, cadaverina), quitosano, poli(amido aminas) (PAMAM), poli(éster amina), polivinil éter, polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG) ciclodextrinas, ácido hialurónico, ácido colomínico, y derivados de los mismos), dendrímeros (por ejemplo, poli(amidoamina), lípidos {por ejemplo, 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP), cloruro de dioleoil-dimetilamonio (DODAC), derivado de la fosfatidilcolina [por ejemplo, 1,2- distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC)], derivados de la liso-fosfatidilcolina [por ejemplo, 1-estearoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina (S- Li soPC)], esfingomielina, 2- { 3 - [bis-(3 -amino-propil)-amino]-propilamino}-N-ditetraacetil carbamoil metilacetamida (RPR209120), derivados del fosfoglicerol [por ejemplo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, sal sódica (DPPG-Na), derivados del ácido fosfatídico [ácido 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatídico, sal sódica (DSPA), derivados de la fosfatidiletanolamina [por ejemplo, dioleoil-J-R-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 2-difitanoi-sn- glicero-3-fosfoetanolamina (DPhiPE)], JV-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 1,3-di-oleoiloxi-2-(6-carboxi-espermiil)-propilamida (DOSPER), (1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxi etil amonio (DMRIE), (N1-colesteriloxicarbonil-3,7-diazanonano-1,9-diamina (CD AN), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC), (b-L-Arginil-2,3-L-ácido diaminopropiónico-N-palmitil-N-oleoil- amida trihidrocloruro (Atu-FECTOI), derivados del 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-dilinoileiloxi-N,N-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil [1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), derivados de la fosfatidilserina [1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina, sal sódica (DOPS)], colesterol}, anfífilos sintéticos (SAINT-18), lipofectina, proteínas (por ejemplo, albumina, gelatinas, atelocolágeno), péptidos (por ejemplo, PepFects, NickFects, poliarginina, polilisina, CADY, MPG)", combinaciones de los mismos y/o proteínas de cápside vírica que sean capaces de auto ensamblarse en partículas que puedan suministrar dicho compuesto u oligonucleótido a una célula. La lipofectina representa un ejemplo de un agente de transfección liposómico. Consiste en al menos dos componentes lipídicos, un lípido catiónico: cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOT-MA) (cp. DOTAP que es la sal metasulfato), y un lípido neutro: dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). El componente neutro interviene en la liberación intracelular. Además de estos materiales de nanopartículas, el péptido catiónico protamina ofrece una estrategia alternativa para formular oligonucleótidos como coloides. Este sistema de nanopartículas coloidal puede formar las llamadas protículas, que se pueden preparar por un simple procedimiento de autoensamblaje de empaquetamiento e interviene en la liberación intracelular de un compuesto como se define en el presente documento. El experto en la técnica puede seleccionar y adaptar cualquiera de los excipientes alternativos y sistemas de suministro anteriores, u otros disponibles en el mercado o no disponibles en el mercado.

En la descripción de la invención, la palabra "genética" se pone entre paréntesis para indicar que las mutaciones en una molécula de ARN diana no necesariamente tiene que codificarse genéticamente. Esto se podría deber a la edición (incorrecta) del ARN, el procesamiento o corte y empalme aberrante del pre-ARN, o cualquier otro mecanismo (desconocido).

En el presente documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitante para decir que los artículos a continuación de la palabra están incluidos, pero los artículos no mencionados específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos de que el contexto claramente necesite que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" por lo tanto significa habitualmente "al menos uno". La palabra "aproximadamente" cuando se utiliza con un valor numérico (por ejemplo, aproximadamente 10) preferentemente significa que el valor puede ser el valor dado (por ejemplo, de 10) más o menos un 0,1 % del valor.

La información de secuencias como se proporciona en el presente documento no se debería considerar estrictamente como que necesita la inclusión de nucleótidos identificados erróneamente. El experto será capaz de identificar dichos nucleótidos identificados erróneamente y sabe cómo corregir dichos errores. En el caso de errores de secuencia, debería prevalecer el ADN genómico, ARNm y secuencias de polinucleótidos del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos que no se deberían considerar como limitantes del ámbito de la invención.

A menos de que se establezca otra cosa, la práctica de la invención empleará procedimientos convencionales de referencia de biología molecular, microbiología y/o bioquímica. Dichas técnicas se describen en Sambrook y col.

(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 y col. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA; y en los Volúmenes I y II de Brown (1998) Molecular Biology LabFax, Segunda Edición, Academic Press (UK); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait editor); Nucleic Acid Hybridization (Hames y Higgins, eds.).

Ejemplo 1

Evaluación *in vivo* de QR-010

El fenotipo de Fibrosis quística (CF) está causado por la ausencia de la proteína CFTR funcional dando como resultado un flujo de cloruro. La CFTR también es un regulador negativo del canal del sodio ENaC. La ausencia de CFTR induce el ENaC, dando como resultado la hiperabsorción de sodio, el desequilibrio adicional del equilibrio osmótico y el empeoramiento del fenotipo de CF. La reparación de CFTR aumenta el transporte de cloruro y tiene como efecto adicional la disminución de hiperabsorción de sodio. La eficacia de un agente para tratar la CFTR se puede medir determinando la diferencia de potencial nasal (NPD) en un modelo de ratón de fibrosis quística (Leal y col, 2006, Lab animals 40: 43-52). Las mediciones de la NPD son una forma de medir corrientes sobre el epitelio nasal en animales y seres humanos. En el presente documento, se determina en el rastro que se genera durante la medición del transporte de sodio calculando la diferencia entre la corriente al inicio y después de la adición de un bloqueador del ENaC. Para la actividad del CFTR, se determina la diferencia entre pre y post cloruro- menos el tampón y/o aplicación de forskolin.

La disminución del potencial indica un tratamiento eficaz debido a la disminución de la actividad del ENaC observada en la CF. El sodio se transporta por el ENaC, que se regula por el CFTR. Debido a la ausencia de CFTR funcional en la CF, el ENaC está regulado negativamente dando como resultado la hiperabsorción de sodio, que a su vez empeora el fenotipo de CF.

El aumento del potencial por inducción con forskolin también indica un tratamiento eficaz, normalmente, en los ratones con CF no existe una respuesta de cloruro-menos CFTR y no hay respuesta CFTR inducida por el forskolin; si se puede observar una corrección estadísticamente significativa de la respuesta de CFTR inducida por el forskolin después del tratamiento, sería una indicación de un tratamiento eficaz.

En resumen, se trataron ocho ratones CF-dF508 con una molécula QR-010 de ProQR (un oligonucleótido con la secuencia representada por la SEQ ID NO: 1). Se administraron a los ratones 40 mg de QR-010 disueltos en 2 ml de agua. Se hizo una medición NPD pretratamiento el día 0, se administró a los ratones la molécula los días 2, 4, y 7 y se midió la NPD postratamiento el día 9. Tres ratones se dosificaron posteriormente los días 10, 13 y 15 y se midió postratamiento el día 17, la medición se llevó a cabo de la siguiente manera de acuerdo con Leal y col, 2006, Lab animals 40: 43-52, con algunas modificaciones, y utilizando un voltímetro de alta impedancia ($> 1,0 \text{ E} + 12 \Omega$) con memoria de datos (Knick Portamesss 913, Elektronische Meßgeräte, Berlín, Alemania). En resumen, se colocaron los ratones boca arriba en una manta eléctrica y las garras y la cola se pegaron con cinta fuera de la vía. Se insertó subcutáneamente un catéter intravenoso con alas (0,719 mm, Insyte-Wt, Becton Dickinson, UT, EE. UU.), lleno con una crema de electrodos diluida (Signa [Parker Labs, Fairfield, NJ, USA] crema/KCl 1 mol/L 1:1 vol/vol) en una extremidad trasera, que servía como puente para conectar el electrodo Ag/AgCl de referencia (SLE Instruments, South Croydon, UK). Se colocó un catéter de doble luz (diámetro externo [DO] 0,3 mm) en el pasaje nasal, una luz se utilizó para la perfusión de soluciones de tampón salino isotónico y la otra servía como electrodo de medición. Su impedancia era $< 1,0 \text{ E} + 6 \Omega$. La lengua del animal se desplazó a un lado y se insertó en la boca una mecha puntiaguda de papel de filtro aproximadamente 1 cm hacia la garganta con el fin de absorber el exceso de líquido de la cavidad oral. El exceso de fluido que salía de la nariz profunda se absorbió con un papel de filtro mantenido en la punta de la nariz, de tal manera que la nariz opesta se mantenía libre de solución. Habitualmente, 5 min después de la inyección de los fármacos, la manta eléctrica se inclinó ligeramente aproximadamente 30 grados, con la cabeza del animal hacia aras, y se comenzó la perfusión nasal a un caudal de 15 ml/min utilizando una bomba peristáltica (PI, Amersham Biosciences, Roosendaal, Países Bajos). Antes de comenzar la perfusión se midió la PD basal hasta que se obtenía un valor estable. Las soluciones se cambiaron solamente después de que se estabilizara la tensión. La solución salina isotónica básica consistía en (mmol/l): Na^+ 140, Cl^- 120, K^+ 5,2, HCO_3^- 25, IPO_4^{2-} 2,4, H_2PO_4^- 0,4, Ca^{2+} 1,2, y Mg^{2+} 1,2. La solución libre de cloro utilizada para detectar en flujo de cloruro del epitelio nasal se preparó sustituyendo el NaCl y CaCl_2 con gluconato equimolar, y el MgCl_2 con MgSO_4 . La osmolaridad era de 275 mOsm/l y el pH era de 7,4. El valor de NPD de partida se debe principalmente a la corriente de sodio generada por el ENaC. Este canal se bloqueó con amilorida para reducir el potencial a cero. Se añadió el tampón libre de cloruros para medir el cloruro transportado por CFTR y se utilizó forskolin para activar el CFTR. Al final del experimento se administraron una dosis fija de naloxona (4 mg), un antagonista morfínico competitivo, y atipamezol, un antídoto específico de la medetomidina (5 veces la dosis de medetomidina), y el animal se mantuvo en una sala en oscuridad en una manta eléctrica hasta la recuperación total, que se producía habitualmente 3-4 h después. Los resultados de las mediciones de NPD se representan en las figuras 5 y 6.

En la figura 5, se representa claramente que el transporte de sodio en los ratones CF se altera al tratarlos con QR-010 ($p = 0,0002$; $n = 8$), moviéndose hacia los niveles de tipo silvestre. Esto es una indicación concreta de que se

restaura la actividad de CFTR con el tratamiento de QR-010.

En la Figura 6, se representa claramente que la respuesta del CFTR inducida por el forskolin se mejora después de 3 dosis de QR-010 ($p = 0,019$; $n = 8$), con una mejora adicional después de 6 dosis de QR-010 ($p = 0,11$; $n = 3$). Normalmente, en los ratones CF no hay una respuesta de CFTR inducida por forskolin; sin embargo, después del tratamiento se observa una corrección de la respuesta de CFTR inducida por el forskolin. Esto es una indicación concreta de que se restaura la actividad de CFTR con el tratamiento de QR-010.

En conjunto, el presente documento se demuestra claramente que un oligonucleótido de acuerdo con la invención tal como el QR-010 es eficaz para la reparación de los defectos genéticos.

Ejemplo 2

10 Actividad de restauración de la secuencia de ARN que codifica el CFTR de tipo silvestre de los oligonucleótidos representados en las SEQ ID NO: 51, 56, 61 y 66.

Los oligonucleótidos representados en las SEQ ID NO: 51, 56, 61 y 66, se ensayaron en cuanto a su actividad de restauración de la secuencia de ARN que codifican el CFTR de tipo silvestre en las células epiteliales primarias de pulmón obtenidas de pacientes que tienen la mutación dirigida al menos en un alelo. Las células se cultivan de acuerdo con los procedimientos conocidos por el experto en la técnica en un medio apropiado. Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención se introducen en las células por transfección. La transfección se lleva a cabo de acuerdo con los procedimientos conocidos por el experto en la técnica con la ayuda del reactivo de transfección lipofectamina, a concentraciones que varían desde 1 a 500 nM. El complejo de oligo-reactivo de transfección se añade a las células en el medio apropiado y se lavan las células 24 h después de la incubación.

20 La actividad de restauración de la secuencia de ARN que codifica el CFTR de tipo silvestre de los oligonucleótidos se determina después de 1 a 4 días de cultivo celular después de la transfección. Se recolectan las células y la actividad de los oligonucleótidos se evalúa a nivel molecular utilizando la reparación de ARN como la lectura primaria. La reparación del ARN se determina por procedimientos de secuenciación o Q-PCR. El ARN se purifica de las células utilizando un procedimiento conocido por el experto en la técnica. Posteriormente, la parte de ARN de CFTR en el que está presente la mutación dirigida se amplifica por RT-PCR. Los productos de la RT-PCR se secuencian para determinar que la mutación se ha reparado como se representa en las Figuras 9A-D.

Leyenda de las figuras

Figura 1. Secuencias parciales del ARN de CFTR de tipo silvestre (WT) y $\Delta F508$ (Mut) rodeando el sitio de delección. Los tres nucleótidos eliminados en el mutante se representan en negrita en la secuencia del WT.

30 **Figura 2.** Representación esquemática de la edición de ARN del ARN de CFTR $\Delta F508$ mutante utilizando un oligonucleótido con la SEQ ID NO: 1. La molécula de ARN reparada (RS) tiene insertados 3 nucleótidos, dando lugar a una secuencia de ARN idéntica al CFTR de tipo silvestre.

Figura 3. Secuencias parciales de ARN y proteína de las moléculas de tipo silvestre, mutantes y reparadas. El mutante pierde la fenilalanina de la posición 508. El ARN reparado resulta de la inserción de una fenilalanina, dando como resultado una secuencia de proteína de tipo silvestre.

Figura 4. Actividad del oligonucleótido de cadena sencilla en cultivos celulares que expresan el CFTR mutante $\Delta F508$ endógeno. Se comparan el oligonucleótido de cadena sencilla y el dúplex de oligonucleótido descrito anteriormente. Se mide la actividad por la detección de la actividad transportadora de cloruro de CFTR.

40 **Figura 5.** Actividad de ENaC representada como el potencial (mV) el ratón de tipo silvestre (WT), ratón CF (CF) y ratón CF tratado con QR-010 (CF-tratada). ** $P < 0,01$; ns = no significativo. Las barras muestran el error estándar de la media (SEM); los valores de p se obtuvieron por el ensayo T no emparejado.

Figura 6. Se representa la respuesta de CFTR inducida por Forskolin como el porcentaje relativo de ratones de tipo silvestre (tipo silvestre), ratones CF sin tratar (CF), ratones CF tratados con 3 dosis de QR-010 (CF 3D) y ratones CF tratados con 6 dosis de QR-010 (CF 6D). Los ratones de tipo silvestre se representan como el 100 %.

45 **Figura 7A.** Se representa la reparación de la mutación delta F508 de CFTR en un ARN diana mediante el oligonucleótido 010g (SEQ ID NO: 1); se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la delección. Se enfatiza el trinucleósido CUU insertado que da como resultado la aparición de una fenilalanina (F) en la posición 508 (UUU) en negrita.

50 **Figura 7B.** Se representa la inserción de dos nucleótidos en la posición 508 del ARN diana de CFTR delta F508 mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 16; se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la delección. Se representa la inserción de dos nucleósidos CU en la posición 508, que produce un cambio de fase en la secuencia codificante.

Figura 7C. Se representa la inserción de un nucleósido en la posición 508 del ARN diana de CFTR delta F508 mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 17; se muestra parte del ARN que rodea el sitio de

la delección. Se representa la inserción del nucleósido C en la posición 508, produciendo un cambio de fase en la secuencia codificante, creando en último término 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 delta F508 mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 18; se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la delección. Se representa la inserción del nucleósido C en la posición 508, produciendo un cambio de fase en la secuencia codificante, creando en último término un codón de parada en la posición 512.

Figura 8. Se representan distintas inserciones en la posición 508 en el ARN diana de CFTR WT.

Figura 8A. Se representa la inserción de un codón de parada en la posición 508 (ATCATCTGA~~TTT~~GGTGTT); SEQ ID NO: 33) en el ARN diana de CFTR WT mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 19; se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la delección. La inserción del codón de parada produce una parada de la traducción después de la posición 507.

Figura 8B. Se representa la inserción de dos nucleótidos en la posición 508 del ARN diana de CFTR WT mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 20; se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la delección. Se representa la inserción de dos nucleósidos GA en la posición 508, produciendo un cambio de fase en la secuencia codificante, creando en último término un codón de parada en la posición 513.

Figura 8C. Se representa la inserción de un nucleósido en la posición 508 del ARN diana de CFTR WT mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 21; se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la delección. Se representa inserción del nucleósido A en la posición 508, produciendo un cambio de fase en la secuencia codificante, creando en último término un codón de parada en la posición 513.

Figura 8D. Se representa la inserción de un codón de leucina (ATCATCCTC~~TTT~~GGTGTT; SEQ ID NO: 40) en la posición 508 en el ARN diana de CFTR WT mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 22; se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la delección. Se muestra la inserción del codón de leucina y el polipéptido resultante.

Figura 8E. Se representa la inserción de un codón de parada a medio camino en el exón 10 del ARN diana de CFTR de WT mediante un oligonucleótido con la secuencia de la SEQ ID NO: 23; se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la delección. La inserción del codón de parada produce una parada de la traducción produce una parada de la traducción después de la posición de aminoácido F494.

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

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

Figura 9B. Se representa la mutación CFTR G542X en un ARN diana mediante el oligonucleótido CFTR-G542 (SEQ ID NO: 56); se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la mutación. La sustitución de "U" por "G" transforma el codón UGA (de parada) en el codón GGA (Gly) y se enfatiza en **negrita**.

Figura 9C. Se representa la reparación de la mutación CFTR W1282X en un ARN diana mediante el oligonucleótido CFTR W1282 (SEQ ID NO: 61); se muestra parte del ARN que rodea el sitio de la mutación. La sustitución de "A" por "G" transforma el codón UGA (de parada) en un codón UGG (Tryp) y se enfatiza en **negrita**.

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

La presente invención se describe adicionalmente mediante las siguientes realizaciones numeradas:

1. El uso de un oligonucleótido para hacer un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva, que comprende la etapa de proporcionar el oligonucleótido a la célula viva en condiciones que permitan la captación por la células viva de dicho oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a la molécula de ARN diana, de manera que la hibridación del oligonucleótido a la ARN diana, o un precursor del mismo, o un armazón del mismo, tiene lugar en dicha célula viva, permitiendo a la maquinaria bioquímica presente en dicha células viva copie una diferencia en la secuencia del oligonucleótido con respecto a la secuencia de la molécula de ARN diana en la molécula de ARN, sea directamente o mediante un precursor de la misma o un armazón de la misma, de manera que se hace un cambio en la secuencia de dicho ARN diana.

2. El uso de acuerdo con la realización 1, en el que el oligonucleótido es un oligorribonucleótido.

3. El uso de acuerdo con la realización 1 o 2, en el que el oligonucleótido se proporciona a la célula viva en forma de cadena sencilla.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que la célula viva es parte de un organismo multicelular.
- 5 5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que la célula viva es una célula animal.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que la célula viva es una célula humana.
- 10 7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el cambio en la secuencia del ARN diana causa que la célula altere su fenotipo.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el cambio en dicho ARN diana se confirma determinando la secuencia de dicho ARN diana, o un precursor del mismo o un armazón del mismo.
- 15 9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el cambio en dicho ARN diana se confirma determinando la secuencia de un producto polipeptídico codificado por dicho ARN diana.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el cambio en dicho ADN diana se confirma determinando un cambio fenotípico en dicha célula viva, o el organismo que comprende dicha célula.
- 20 11. El uso de acuerdo con la realización 10, en el que el cambio es una mejora de un trastorno relacionado causalmente con la secuencia del ARN diana antes del cambio.
12. El uso de acuerdo con la realización 10, en el que el trastorno es un trastorno genético.
13. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el oligonucleótido tiene una longitud de 15-100 nucleótidos.
- 25 14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que la longitud del oligonucleótido está entre 20 y 50, más preferentemente entre 25 y 45 nucleótidos, más preferentemente 27 y 35 nucleótidos.
- 30 15. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el oligonucleótido comprende una inosina y/o comprende nucleótidos modificados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en nucleósidos 2'-O alquil ribosa, 2' fluoro ribosa, PMO, 5-metil-dC, 2-amino-dA, C5-pirimidina y/o enlaces entre nucleósidos modificados seleccionados de entre el grupo que consiste en enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato.
16. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el oligonucleótido comprende un ARN, ADN, PNA y/o LNA.
- 35 17. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que todos los nucleósidos del oligonucleótido son nucleósidos 2'-O alquil ribosa, preferentemente, nucleósidos 2'-O metil ribosa.
18. El uso de acuerdo con la realización 17, en el que todos los nucleósidos son ribonucleósidos.
19. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el cambio en la secuencia de la molécula de ARN diana comprende una inserción o una sustitución de uno o más nucleósidos.
- 40 20. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones preferentes, en el que el ARN diana codifica el CFTR humano y el cambio da como resultado la creación o restauración de un triplete de nucleósidos que codifica la fenilalanina en la posición de aminoácido 508 de la proteína CFTR.
21. El uso de acuerdo la realización 20, en el que el cambio comprende la inserción de un triplete de nucleósido seleccionado de entre el grupo que consiste en 5-UUU-3' y 5'-CUU-3'.
- 45 22. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el oligonucleótido es complementario de una secuencia que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de 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 entre el grupo que consiste en 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3'.
- 50 23. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el oligonucleótido comprende o consiste en los nucleótidos 7-29, preferentemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 3, preferentemente la SEQ ID NO: 1.

24. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el oligonucleótido se proporciona en un vehículo, preferentemente un liposoma, polisoma, o nanopartícula y/o en el que el oligonucleótido forma un complejo con un compuesto de suministro, preferentemente polietilenimina (PEI), polietilenglicol (PEG), y/o está unido a un esteroide, preferentemente colesterol.
- 5 25. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el oligonucleótido se proporciona al pulmón, preferentemente mediante las vías aéreas, en una formulación seca o en una aerosol preferentemente utilizando un nebulizador, y preferentemente el oligonucleótido se proporciona junto con un mediador de transfección y/o una medicina para la fibrosis quística conocidos por el experto en la técnica, preferentemente una DNasa, manitol (preferentemente Bronchitol) y/o una molécula pequeña para el tratamiento de CF, preferentemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.
- 10 26. El uso de acuerdo con la realización 25, en el que el oligonucleótido se proporciona en una solución salina hipertónica, preferentemente de entre un 2 %-9 % de concentración salina, preferentemente 3 %-8 %, más preferentemente 4 %-8 %, más preferentemente 5 %-8 %, más preferentemente 6 %-8 %, más preferentemente 6 %-7 %, más preferentemente aun aproximadamente un 7 % de concentración salina, en el que la solución salina hipertónica es preferentemente una solución fisiológica y farmacéuticamente aceptable.
- 15 27. El uso de acuerdo con la realización 26, en el que la solución salina hipertónica es esencialmente una solución de NaCl.
28. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el oligonucleótido se administra en una partícula de penetración en el mucus, preferentemente una nanopartícula de penetración en el mucus.
- 20 29. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que la administración del oligonucleótido se combina con un tratamiento antibiótico para reducir las infecciones bacterianas y los síntomas de estas tales como el engrosamiento del mucus y/o la formación de biopelícula.
30. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes en el que se aplica un lavado broncoalveolar (BAL) antes de la administración del oligonucleótido de acuerdo con la invención.
- 25 31. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-24, en el que el oligonucleótido se administra en una cápsula de liberación en el tiempo para facilitar el suministro a las células intestinales.
32. El uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que la administración del oligonucleótido se combina con la administración de una composición enzimática pancreática biológica o sintética tal como pancrelipase o Creon.
- 30 33. Un oligonucleótido para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal, en el que dicho oligonucleótido es capaz de hacer un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva de dicho cuerpo humano o animal, proporcionando el oligonucleótido a la célula viva en condiciones que permitan la captación por la célula viva de dicho oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido comprende una secuencia que es al menos complementaria de la molécula de ARN diana, de manera que la hibridación del oligonucleótido con el ARN diana, o un precursor del mismo, o un armazón del mismo, tiene lugar en dicha célula viva, permitiendo que la maquinaria bioquímica presente en dicha célula viva copie una diferencia de la secuencia del oligonucleótido con respecto a la molécula de ARN diana en la molécula de ARN, sea directamente o mediante un precursor de la misma o un armazón de la misma, de manera que se hace el cambio en dicho ARN diana.
- 35 34. Un oligonucleótido de acuerdo con la realización 33, en el que el oligonucleótido es un oligorribonucleótido.
- 40 35. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 o 34, en el que el cambio en la secuencia del ARN diana causa que la célula altere su fenotipo.
36. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 35, en el que el cambio en dicho ARN diana se confirma determinando la secuencia de dicho ARN diana, o un precursor del mismo o un armazón del mismo.
- 45 37. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 36, en el que el cambio en dicho ARN diana se confirma determinando la secuencia de un producto polipeptídico codificado por dicho ARN diana.
38. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 37, en el que el cambio en la secuencia de dicho ADN diana se confirma determinando un cambio fenotípico en dicha célula viva, o el organismo que comprende dicha célula.
- 50 39. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 38, en el que el cambio fenotípico es una mejora de un trastorno relacionado causalmente con la secuencia del ARN diana antes del cambio.
40. Un oligonucleótido de acuerdo con la realización 39, en el que el trastorno es un trastorno genético.

41. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 40, en el que el oligonucleótido tiene una longitud de 15-100 nucleótidos.
- 5 42. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 41, en el que la longitud del oligonucleótido está entre 20 y 50, más preferentemente entre 25 y 45 nucleótidos, más preferentemente 27 y 35 nucleótidos.
- 10 43. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 42, en el que el oligorribonucleótido comprende una inosina y/o comprende nucleótidos modificados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en nucleósidos 2'-O alquil ribosa, 2' fluoro ribosa, PMO, 5-metil-dC, 2-amino-dA, C5-pirimidina y/o enlaces entre nucleósidos modificados seleccionados de entre el grupo que consiste en enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato.
44. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 43, en el que el oligonucleótido comprende un ARN, ADN, PNA y/o LNA.
45. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 44, en el que el cambio en la secuencia de la molécula de ARN diana comprende una inserción o una sustitución de uno o más nucleósidos.
- 15 46. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 - 45, en el que el ARN diana codifica el CFTR humano y el cambio da como resultado la creación o restauración de un triplete de nucleósidos que codifica la fenilalanina en la posición de aminoácido 508 de la proteína CFTR.
47. Un oligonucleótido de acuerdo con la realización 46, en el que el cambio comprende la inserción de un triplete de nucleósido seleccionado de entre el grupo que consiste en 5-UUU-3' y 5'-CUU-3'.
- 20 48. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 46 o 47, en el que el oligonucleótido es complementario de una secuencia que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de 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 entre el grupo que consiste en 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3'.
- 25 49. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 48, en el que el oligonucleótido comprende o consiste en los nucleótidos 7-29, preferentemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 3, preferentemente la SEQ ID NO: 1.
- 30 50. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 49, en el que el oligonucleótido se proporciona en un vehículo, preferentemente un liposoma, polisoma, o nanopartícula y/o en el que el oligonucleótido forma un complejo con un compuesto de suministro, preferentemente polietilénimina (PEI), polietilenglicol (PEG), y/o está unido a un esteroide, preferentemente colesterol.
- 35 51. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 50, en el que el oligonucleótido se proporciona al tracto respiratorio o el pulmón, preferentemente mediante las vías aéreas, en una formulación seca o en una aerosol preferentemente utilizando un nebulizador, y preferentemente el oligonucleótido se proporciona junto con un mediador de transfección y/o una medicina para la fibrosis quística conocidos por el experto en la técnica, preferentemente una DNasa, manitol (preferentemente Bronchitol) y/o una molécula pequeña para el tratamiento de CF, preferentemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.
- 40 52. Un oligonucleótido de acuerdo con la realización 51, en el que el oligonucleótido se proporciona en una composición salina hipertónica, preferentemente de entre un 2 %-9 % de concentración salina, preferentemente 3 %-8 %, más preferentemente 4 %-8 %, más preferentemente 5 %-8 %, más preferentemente 6 %-8 %, más preferentemente 6 %-7 %, más preferentemente aun aproximadamente un 7 % de concentración salina, en el que la solución salina hipertónica es preferentemente una solución fisiológica y farmacéuticamente aceptable.
53. Un oligonucleótido de acuerdo con la realización 52, en el que la solución salina hipertónica es esencialmente una solución de NaCl.
- 45 54. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 51 a 53, en el que el oligonucleótido se administra en una partícula de penetración en el mucus, preferentemente una nanopartícula de penetración en el mucus.
- 50 55. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 51 a 54, en el que la administración del oligonucleótido se combina con un tratamiento antibiótico para reducir las infecciones bacterianas y los síntomas de estas tales como el engrosamiento del mucus y/o la formación de biopelícula.
56. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 51 a 55, en el que se aplica un lavado broncoalveolar (BAL) antes de la administración del oligonucleótido de acuerdo con la invención.
57. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 33 a 53, en el que el oligonucleótido

se administra en una cápsula de liberación en el tiempo para facilitar el suministro a las células intestinales.

58. Un oligonucleótido de acuerdo con la realización 57, en el que la administración del oligonucleótido se combina con la administración de una composición enzimática pancreática biológica o sintética tal como pancrelipase o Creon.

5 59. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido como se define en una cualquiera de las realizaciones 33 a 49, un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o una solución salina hipertónica fisiológica y farmacéuticamente aceptable, preferentemente de entre un 2 %-9 % de concentración salina, preferentemente 3 %-8 %, más preferentemente 4 %-8 %, más preferentemente 5 %-8 %, más preferentemente 6 %-8 %, más preferentemente 6 %-7 %, más preferentemente aun aproximadamente un 7 % de concentración salina.

10 60. Una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 59, en la que la solución salina hipertónica es esencialmente una solución de NaCl.

61. Una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 59 o 60, que comprende adicionalmente un mediador de la transfección.

15 62. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 59 a 61, que comprende adicionalmente una medicina para la fibrosis quística conocida por el experto en la técnica, preferentemente una DNasa, manitol (preferentemente Bronchitol) y/o una molécula pequeña para el tratamiento de la CF, preferentemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.

20 63. Un oligorribonucleótido de cadena sencilla o una composición farmacéutica que comprende un oligorribonucleótido de cadena sencilla que es complementaria a una secuencia que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con los nucleótidos 16-30 y 34-48 de la SEQ ID NO: 6.

64. Un oligorribonucleótido de cadena sencilla o una composición farmacéutica que comprende un oligorribonucleótido de cadena sencilla que comprende los nucleótidos 7-29, preferentemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, preferentemente la SEQ ID NO: 1.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ProQR Therapeutics II B.V.

30 <120> Oligonucleótidos para la realización de un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva

<130> P068284EP

<160> 70

35 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

40 <211> 33

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

45 <223> Oligonucleótido

<400> 1

aucauaggaa acaccaaaga ugauuuuuuc uuu 33

<210> 2

50 <211> 11

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

55 <223> Oligonucleótido

<220>

<221> función_misc

<222> (1)..(1)

<223> U está fosforilado
 <220>
 <221> función_misc
 5 <222> (11)..(11)
 <223> U está fosforilado
 <400> 2
 10 ucauuuuugg u 11
 <210> 3
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 3
 20 aucauaggaa acaccaaaaa ugauuuuuc uuu 33
 <210> 4
 <211> 11
 <212> ARN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 30 <220>
 <221> función_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> U está fosforilado
 35 <220>
 <221> función_misc
 <222> (11)..(11)
 <223> U está fosforilado
 40 <400> 4
 ucaucuuugg u 11
 <210> 5
 <211> 63
 45 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR
 <400> 5
uaugccuggc accauaaaag aaaauaucau cuuugguguu uccuaugaug aaauagaua 60
cag 63
 55 <210> 6
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

ES 2 698 522 T3

<400> 6
 uaugccuggc accauaaaag aaaauaucu ugguguuucc uaugaugaau auagauacag 60

5 <210> 7
 <211> 30
 <212> ARN
 <213> Artificial

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

<400> 7
 uaugccuggc accauaaaag aaaauaucu 30

15 <210> 8
 <211> 30
 <212> ARN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

<400> 8
 ugguguuucc uaugaugaau auagauacag 30

25 <210> 9
 <211> 63
 <212> ARN
 <213> Artificial

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

35 <400> 9
uaugccuggc accauaaaag aaaauaucu cuuugguguu uccuaugaug aaauagaua 60
cag 63

40 <210> 10
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>

45 <223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

<400> 10
 augccuggca ccauuaaaga aaauaucu uuugguguuu ccuaugauga auauagauac 60

50 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Péptido

<400> 11

ES 2 698 522 T3

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

5 <210> 12
<211> 57
<212> ARN
<213> Artificial

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

<400> 12
augccuggca ccauuuaaga aaauaucuu gguguuuccu augaugaaua uagauac 57

15 <210> 13
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido

<400> 13

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

Tyr Arg Tyr

25 <210> 14
<211> 60
<212> ARN
<213> Artificial

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

35 <400> 14
augccuggca ccauuuaaga aaauaucuuc uuugguguuu ccuaugauga auauagauac 60

40 <210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido

45 <400> 15

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

<210> 16
 <211> 32
 <212> ARN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido dF-ins1
 <400> 16
 10 aucauaggaa acaccaagau gauuuuuuucu uu 32
 <210> 17
 <211> 31
 <212> ARN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido dF-ins1
 20 <400> 17
 aucauaggaa acaccagaug auuuuuuucu u 31
 <210> 18
 <211> 33
 25 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido dF-ins1 33b
 30 <400> 18
 cauauaggaa aacaccagau gauuuuuuucu uua 33
 <210> 19
 <211> 33
 35 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido CFTR WT X
 <400> 19
 auaggaaaca ccaaaaucgau ugauuuuuuuc uuu 33
 <210> 20
 <211> 32
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR WT Ins2
 <400> 20
 50 auaggaaaca ccaaaaucgau gauuuuuuucu uu 32
 55 <210> 21
 <211> 31
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR WT Ins1
 <400> 21
 65 auaggaaaca ccaaaaugaug auuuuuuucu u 31

<210> 22
 <211> 33
 <212> ARN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR WT L

 10 <400> 22
 auaggaaaca ccaaagagga ugauuuuuuc uuu 33

 <210> 23
 <211> 33
 15 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR WT OX
 20
 <400> 23
 aggcuaaauc caggaucaaa acugagaaca gaa 33

 <210> 24
 25 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido CFTR WT OL

 <400> 24
 auggugccag gcauaaggau ccaggaaaac uga 33

 35 <210> 25
 <211> 42
 <212> ARN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Parte del ARN deltaF508

 <400> 25
 45 accauuaaag aaaauaucu ugguguuucc uaugaugaau au 42

 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Parte del polipéptido delta F508

 <400> 26
 55

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

 <210> 27
 <211> 45
 60 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Parte del ARN WT

ES 2 698 522 T3

<400> 27
 accauuaaag aaaauaucu cuugguguu uccuaugaug aaau 45

5 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Parte del polipéptido WT

<400> 28

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

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

20 <220>
 <223> Parte del ARN WT con la inserción de CU

25 <400> 29
 accauuaaag aaaauaucu cuugguguuu ccuaugauga auaua 45

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

30 <220>
 <223> Parte del polipéptido WT con cambio de fase

35 <400> 30

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

40 <210> 31
 <211> 43
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Parte del ARN delta F508 con la inserción C

<400> 31
 accauuaaag aaaauaucu cugguguuuc cuaugaugaa uau 43

50 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Parte del polipéptido delta F508 con parada prematura

<400> 32

60

ES 2 698 522 T3

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

5 <210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Parte del ADN delta F508 con codón de parada en la posición 508

10 <400> 33
 atcatctgat ttggtgtt 18

15 <210> 34
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Parte del ARN delta F 508, con codón de parada en la posición 508

20 <400> 34
 accauuaaag aaaauaucou cugauuuggu guuuccuauug augaa 45

25 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Parte del polipéptido CFTR WT con codón de parada insertado en la posición 508
 <400> 35

Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile
1 5

35 <210> 36
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Parte del ARN CFTR WT con la inserción de GA

45 <400> 36
 accauuaaag aaaauaucou cgauuuggug uuuccuauuga ugaau 45

50 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Parte del polipéptido CFTR WT con cambio de fase inducido por la inserción de GA

<400> 37

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

<210> 38

ES 2 698 522 T3

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

5 <220>
 <223> Parte del ARN CFTR WT con la inserción de A

<400> 38
 accauuaaag aaaaaucau cauuuggugu uuccuaugau gaaua 45

10 <210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Parte del polipéptido CFTR WT con cambio de fase inducido por el codón de parada en la posición 513

<400> 39

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

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

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

30 <400> 40
 atcatcctct ttggtgtt 18

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

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

<400> 41
 accauuaaag aaaaaucau ccucuuuggu guuuccuaug augaa 45

45 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Parte del polipéptido CFTR WT con Leucina insertada en la posición 508

<400> 42

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

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

60

ES 2 698 522 T3

	Phe	Cys	Ser	Gln	Phe	Ser	Trp	Ile	Met	Pro	Gly	Thr	Ile	Lys	Glu	Asn
	1				5					10					15	
5	<210> 49															
	<211> 48															
	<212> ARN															
	<213> Artificial															
	<220>															
10	<223> Parte del ARN CFTR WT con la inserción del codón de Leucina en la posición 498															
	<400> 49															
	uucuguucuc aguuuuccug gaucuuuug ccuggcacca uuaaagaa 48															
15	<210> 50															
	<211> 16															
	<212> PRT															
	<213> Artificial															
	<220>															
20	<223> Parte del polipéptido CFTR WT con la inserción de Leucina en la posición 498															
	<400> 50															
	Phe	Cys	Ser	Gln	Phe	Ser	Trp	Ile	Leu	Met	Pro	Gly	Thr	Ile	Lys	Glu
	1				5					10					15	
25	<210> 51															
	<211> 33															
	<212> ARN															
	<213> Artificial															
30	<220>															
	<223> Oligonucleótido CFTR-R117															
	<400> 51															
35	auaaaucgcg auagagcguu ccuccuuguu auc 33															
	<210> 52															
	<211> 45															
	<212> ARN															
40	<213> Artificial															
	<220>															
	<223> Parte del ARN 117H															
45	<400> 52															
	gaccoggaau acaaggagga acacucuauc gcgauuuuau uaggc 45															
	<210> 53															
	<211> 15															
	<212> PRT															
50	<213> Artificial															
	<220>															
	<223> Parte del polipéptido 117H															
55	<400> 53															
	Asp	Pro	Asp	Asn	Lys	Glu	Glu	His	Ser	Ile	Ala	Ile	Tyr	Leu	Gly	
	1				5					10				15		

ES 2 698 522 T3

<210> 54
 <211> 45
 <212> ARN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Parte del ARN CFTR WT

 10 <400> 54
 gaccCGGaua acaaggagga acgcucuauc gCGauuuauC uaggc 45

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

 <220>
 <223> Parte del polipéptido CFTR WT

 20 <400> 55

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

 <210> 56
 25 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido CFTR-G542

 <400> 56
 gUGauuccac cuucuccaag aacuaauauug ucu 33

 35 <210> 57
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Parte del ARN 542X

 <400> 57
 45 gAgaaagaca auauaguucu uugagaaggu gGaaucacac ugagu 45

 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Parte del polipéptido 542X truncado

 <400> 58
 55

Glu	Lys	Asp	Asn	Ile	Val	Leu
1				5		

 <210> 59
 60 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

ES 2 698 522 T3

<220>
 <223> Parte del ARN CFTR WT

5 <400> 59
 gagaaagaca auauaguucu uggagaaggu ggaaucacac ugagu 45

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte del polipéptido CFTR WT

15 <400> 60

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

<210> 61
 20 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Oligonucleótido CFTR-W1282

<400> 61
 cuccaaaggc uuuccuccac uguugcaaag uua 33

30 <210> 62
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Parte del ARN 1282X

<400> 62
 gauucaauaa cuuugcaaca gugaaggaaa gccuuuggag ugaua 45

40 <210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Parte del polipéptido 1282X truncado

<400> 63

50

Asp Ser Ile Thr Leu Gln Gln
1 5

<210> 64
 <211> 45
 55 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte del ARN CFTR WT

ES 2 698 522 T3

<400> 64
 gauucaauaa cuuugcaaca guggaggaaa gccuuuggag ugaua 45

5 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 65

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

15 <210> 66
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR-N1303

<400> 66
 25 guucauaggg auccaaguuu uuucuaaaug uuc 33

<210> 67
 <211> 45
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte del ARN 1303K

35 <400> 67
 uuucuggaa cauuuagaaa aaaguuggau ccuaugaac agugg 45

<210> 68
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte del PP 1303K

45 <400> 68

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

50 <210> 69
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Parte del ARN CFTR WT

<400> 69
 60 uuucuggaa cauuuagaaa aaacuuggau ccuaugaac agugg 45

ES 2 698 522 T3

<210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Parte del polipéptido CFTR WT

10

<400> 70

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido de cadena sencilla para el direccionamiento de una secuencia de ARN diana que comprende una mutación, para su uso en el tratamiento de un trastorno genético relacionado con la mutación en dicha secuencia de ARN diana, en donde el oligonucleótido comprende una secuencia complementaria de la secuencia de ARN diana y codifica la secuencia de tipo silvestre, y en donde todos los nucleósidos del oligonucleótido son 2'-O-
alquil ribonucleósidos.
2. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que todos los nucleósidos del oligonucleótido son 2'-O-metil ribonucleósidos,
- 10 3. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el oligonucleótido comprende enlaces entre nucleósidos modificados seleccionados de entre el grupo que consiste en enlaces fosforotioato y enlaces metilfosfonato.
4. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha mutación es una sustitución, una delección o una inserción.
- 15 5. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de 15 a 100 nucleótidos, de los cuales al menos 10 son complementarios de la secuencia de ARN diana.
- 20 6. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho trastorno genético se selecciona de entre el grupo que consiste en fibrosis quística, albinismo, deficiencia de alfa-1-antitripsina, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, asma, β -talasemia, síndrome de Cadasil, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), atrofia muscular espinal (AME) distal, distrofia muscular de Duchenne/Becker, epidermólisis distrófica bullosa, epidermólisis bullosa, enfermedad de Fabry, Adenomatosis familiar, poliposis, galactosemia, enfermedad de Gaucher, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, hemofilia, hematocromatosis hereditaria, síndrome de Hunter, enfermedad de Huntington, síndrome de Hurler, enfermedad intestinal inflamatoria (EII), síndrome de poliaglutinación heredado, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Lynch, síndrome de Marfan, mucopolisacaridosis, distrofia muscular, distrofia miotónica tipos I y II, enfermedad de Niemann-Pick tipos A, B y C, cáncer relacionado con NY-esol, enfermedad de Parkinson, síndrome de Peutz-Jeghers, fenilcetonuria, enfermedad de Pompe, enfermedad ciliar primaria, hipertensión pulmonar, retinitis pigmentaria, enfermedad de Sandhoff, síndrome de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), anemia de células falciformes, atrofia muscular espinal, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Tay-Sachs e
30 inmunodeficiencia ligada a X.
7. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho trastorno genético es fibrosis quística y la secuencia de ARN diana codifica un CFTR humano que comprende la mutación $\Delta F508$.
- 35 8. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el oligonucleótido es complementario de una secuencia que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % de identidad de secuencia con los nucleótidos 16-30 y 34-48 de la SEQ ID NO: 5.
9. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.
- 40 10. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o una solución salina hipertónica fisiológica y farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

SEQ ID NO:5 WT UAUGCCUGGCACCAUUAAGAAAAAUACAUCUUUGGUGUUUCUAUGAUGAAAUAGAUACAG
SEQ ID NO:6 Mut UAUGCCUGGCACCAUUAAGAAAAAUACAUCUUUGGUGUUUCUAUGAUGAAAUAGAUACAG

Fig. 2

SEQ ID NO:7 Mut UAUGCCUGGCACCAUUAAGAAAAAUACAUCUUUGGUGUUUCUAUGAUGAAAUAGAUACAG SEQ ID NO:8
SEQ ID NO:1 UUUUUUUUUAGUAGAAACCACAAAGGAUACUA
↓
SEQ ID NO:9 RS UAUGCCUGGCACCAUUAAGAAAAAUACAUCUUUGGUGUUUCUAUGAUGAAAUAGAUACAG

Fig. 3

```

SEQ ID NO:10 WT  augccuggcaccacuuuaaaggaaaaauuaucacuuucuuugguugucuaaigauggaaucagaauac
SEQ ID NO:11  M P G T I K E N I I P G Y S Y D E Y R Y

SEQ ID NO:12 Mut augccuggcaccacuuuaaaggaaauuaucacuuugguugucuaaigauggaaucagaauac
SEQ ID NO:13  M P G T I K E N I I G Y S Y D E Y R Y

SEQ ID NO:14 RS  augccuggcaccacuuuaaaggaaauuaucacuuugguugucuaaigauggaaucagaauac
SEQ ID NO:15  M P G T I K E N I I F G Y S Y D E Y R Y
    
```

Fig. 4

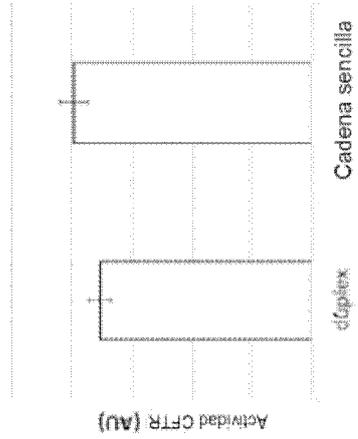


Fig. 5

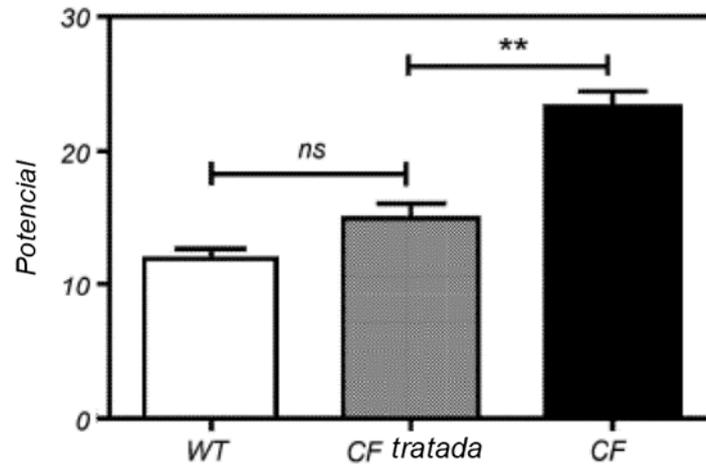


Fig. 6

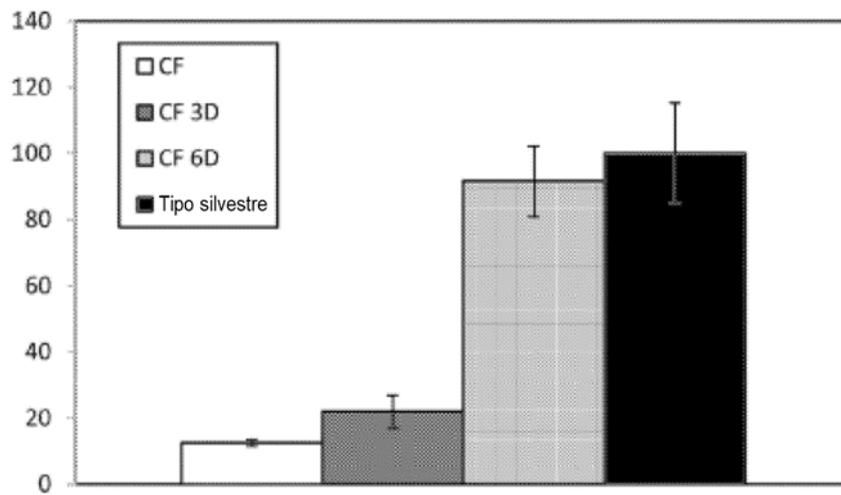


Fig 7a

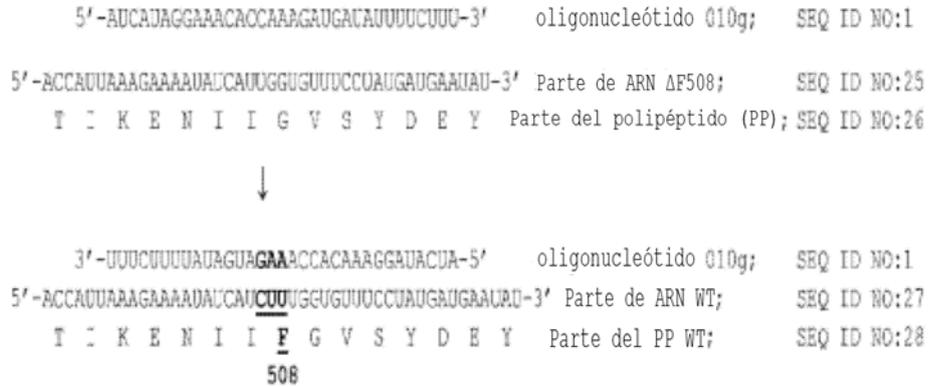


Fig 7b

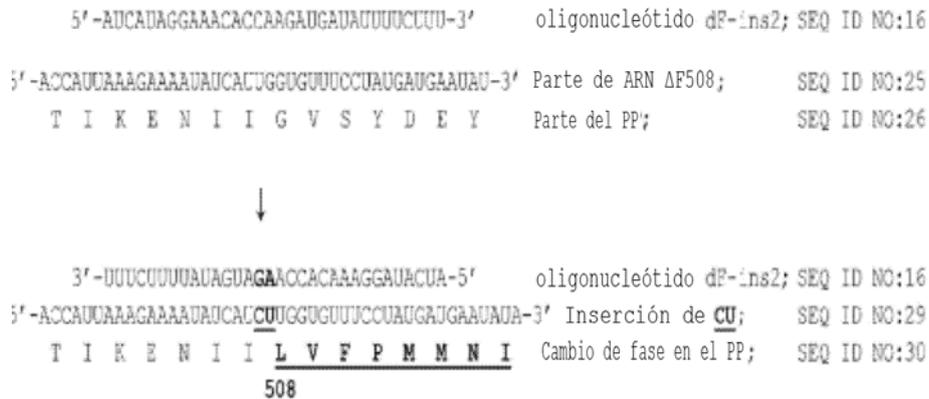


Fig 7c

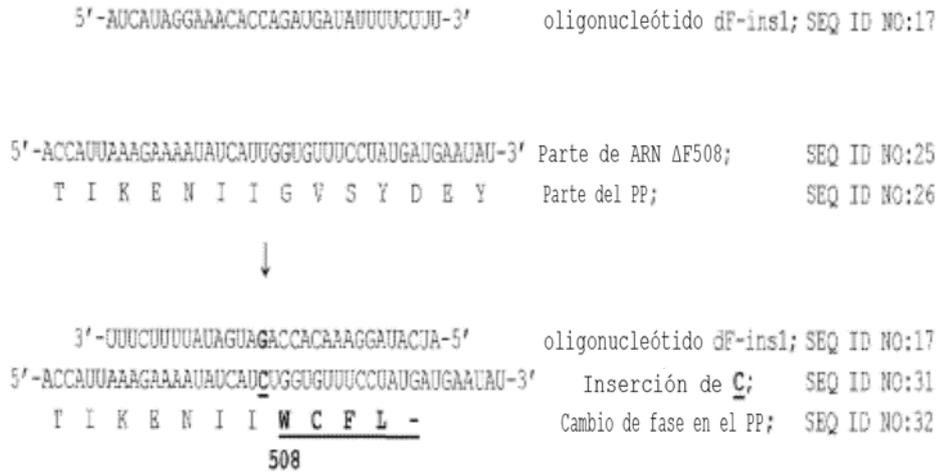


Fig 7d

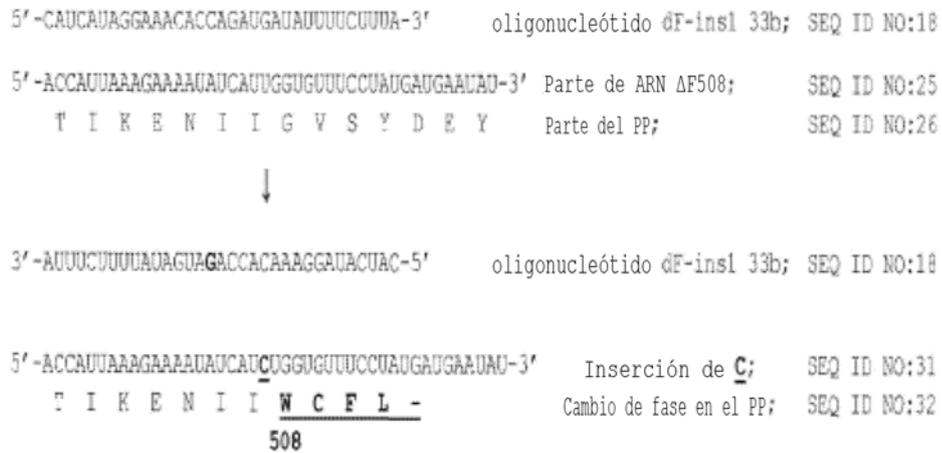


Fig 8a

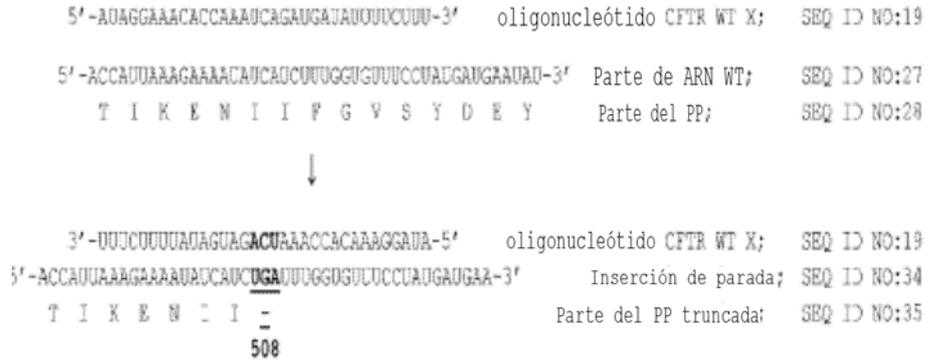


Fig 8b

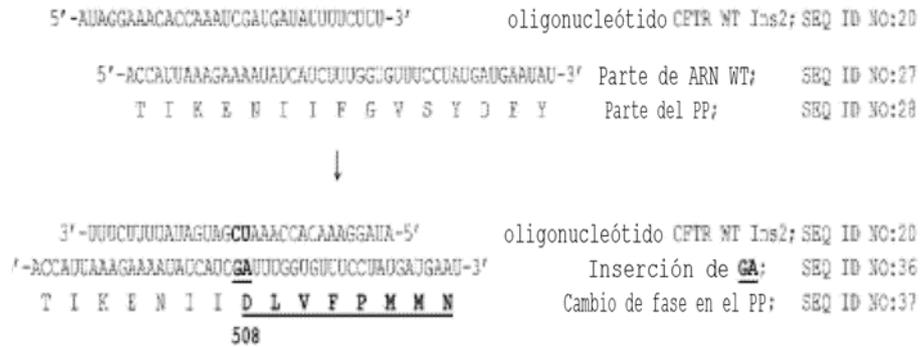


Fig 8c

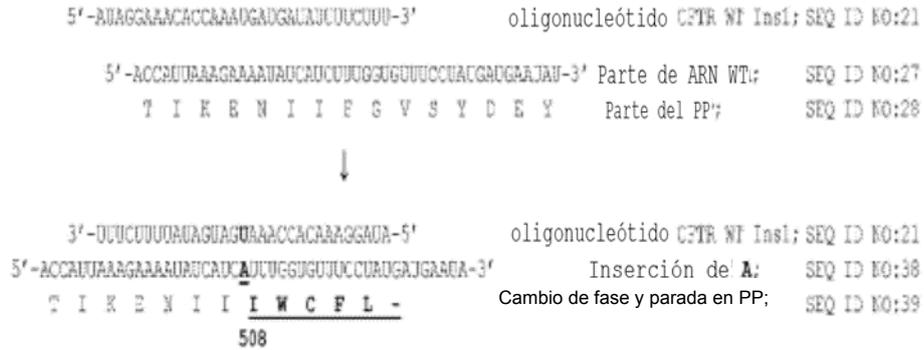


Fig 8d

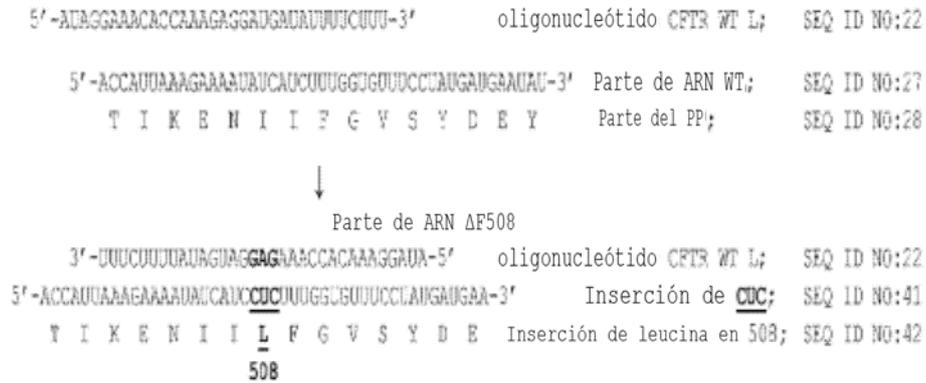


Fig 8e

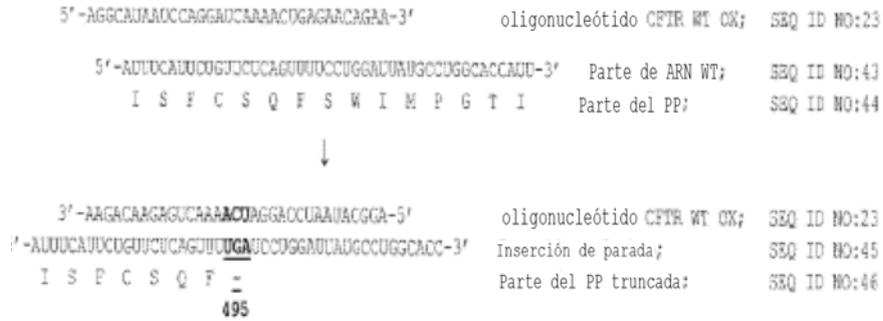


Fig 8f

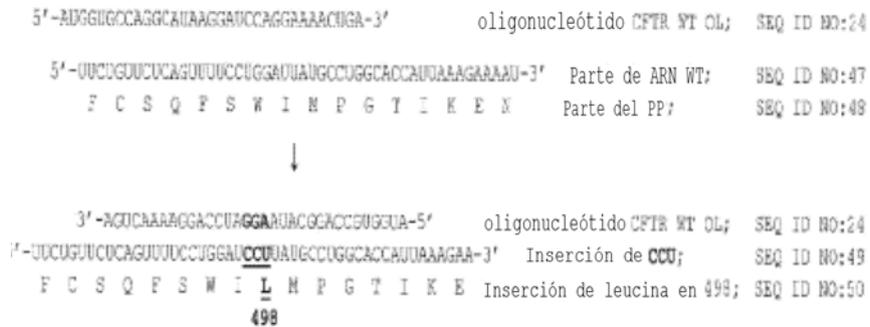


Fig. 9a

5'--UUUUAUUGGGUUUAGACGCUUUCUCCUUCUUGUUC-3' oligonucleótido CFTR-R117; SEQ ID NO: 51

5'--GUCCCGUAUACAGGAGGACACUCCUUCGCAUUUUCUUGCC-3' Parte de ARN 117H SEQ ID NO: 52
 D P D N K E E E S I A I Y L G Parte del polipéptido (PP); SEQ ID NO: 55

↓

5'--UUUUAUUGGGUUUAGACGCUUUCUCCUUCUUGUUC-5' oligonucleótido CFTR-R117; SEQ ID NO: 51
 5'--GUCCCGUAUACAGGAGGACACUCCUUCGCAUUUUCUUGCC-3' Parte de ARN WT SEQ ID NO: 54
 D P D N K E E R S I A I Y L G Parte del PP WT; SEQ ID NO: 55

117

Fig. 9c

5'-CUCGAAAGGSCUUUCCUCCACUCUUCGCAAAUUUA-3'	oligonucleótido CFTR-W1282;	SEQ ID NO: 61
5'-CAUUCANUNCCUUUCCAAACGCGAAGCGAAGCCUUNCGGUGUA-3'	Parte de ARN 1282X;	SEQ ID NO: 62
D S I T L Q Q =	Parte del PP truncada;	SEQ ID NO: 63
	↓	
3'-AUGGAACGCUUUCACUCUCCUUUGGAAACUC-5'	oligonucleótido CFTR-W1282;	SEQ ID NO: 61
5'-GAAUCAAUAACUUUGCAACGUGGAGGAAAGCCUUUGGAGUGAUA-3'	Parte de ARN WT;	SEQ ID NO: 64
D S I T L Q Q W R R A S G V I	Parte del PP WT;	SEQ ID NO: 65

1282

