

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 355**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2015 PCT/IB2015/053730**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177743**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2015 E 15732387 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3145553**

54 Título: **ARN de interferencia pequeño (ARNip) para la terapia de osteopetrosis autosómica dominante de tipo 2 (ADO2) provocada por mutación del gen CLCN7 (ADO2 dependiente de CLCN7)**

30 Prioridad:

**23.05.2014 IT RM20140272**

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

**08.04.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'AQUILA  
(100.0%)  
Via Camponeschi 2  
67100 L'Aquila, IT**

72 Inventor/es:

**TETI, ANNA MARIA;  
RUCCI, NADIA;  
CAPULLI, MATTIA y  
MAURIZI, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**ES 2 753 355 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

ARN de interferencia pequeño (ARNip) para la terapia de osteopetrosis autosómica dominante de tipo 2 (ADO2) provocada por mutación del gen *CLCN7* (ADO2 dependiente de *CLCN7*)

### Sector técnico de la invención

La presente invención se encuentra en el sector de moléculas conocidas como "ARN de interferencia pequeño" con aplicaciones terapéuticas. Los ARNip tienen la capacidad de reducir la expresión génica de una manera extremadamente eficaz (1). Se trata de secuencias pequeñas de ARN de cadena doble, utilizadas normalmente en laboratorio para modificar la función celular, que revolucionaron la biología celular al permitir manipulaciones moleculares descartadas anteriormente.

### Estado de la técnica anterior

La ADO2 dependiente de *CLCN7* es una afección genética que afecta a 5 individuos de cada 100.000 recién nacidos (2). En general, aparece en sujetos en edad adolescente o adultos (3), aunque se conocen diversos casos de ADO2 dependiente de *CLCN7* infantil (4). La enfermedad está caracterizada por la ausencia de función de células óseas denominadas osteoclastos (5) y se presenta con huesos muy densos pero frágiles, hemopoyesis y trastornos de la función sensoriomotora, osteomielitis y problemas dentales. En general, la esperanza de vida es normal; sin embargo, aunque con poca frecuencia, se puede producir la muerte temprana del individuo afectado. En cambio, la calidad de vida se puede ver notablemente comprometida debido a numerosas fracturas atraumáticas, difíciles de reducir quirúrgicamente, y a una sintomatología hematológica y neurológica gravemente debilitante (6). En general, las facultades cognitivas están conservadas, aunque pueden aparecer déficits significativos en los casos más graves (6). La ADO2 dependiente de *CLCN7* está caracterizada por una penetrancia incompleta, ya que tan sólo aproximadamente el 66 % de los individuos afectados por la mutación manifiestan la enfermedad (7). Tiene una gravedad extremadamente variable, que oscila desde pacientes caracterizados por ausencia de síntomas hasta pacientes notablemente comprometidos (6-8).

La ADO2 dependiente de *CLCN7* se debe a una mutación del gen *CLCN7* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001114331.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001114331.2)), compuesto por 25 exones y ubicado en el cromosoma 16 en los seres humanos y en el cromosoma 17 en el ratón, que codifica una proteína, denominada CIC-7 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_001107803.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001107803.1)), esencial para la función de osteoclastos (5), que sirve para el transporte transmembrana de cloro. La ADO2 es autosómica, ya que el gen reside en un cromosoma no sexual, y es dominante, ya que son mutaciones puntuales de un gen que codifica una proteína homodimérica. En las mutaciones puntuales, se produce toda la proteína, pero muestra un cambio de aminoácido que modifica su función. En los homodímeros existen dos subunidades idénticas. Existen dos copias de cada gen, y en la ADO2 dependiente de *CLCN7* sólo uno de los dos genes es mutante (está mutado), por tanto en las células se forman homodímeros con ambas subunidades normales, así como heterodímeros con tan sólo una subunidad mutante y homodímeros con ambas subunidades mutantes. Esencialmente, en los individuos afectados sólo un tercio de las proteínas funcionan correctamente.

En los pacientes en los que la mutación determina la ausencia total de la proteína, la enfermedad, denominada osteopetrosis autosómica recesiva, es mucho más grave porque ambos genes son mutantes (9). Si en vez de eso, uno de los genes no es mutante, provoca la producción de proteína normal suficiente como para no dejar que se desarrolle la enfermedad. Este estado se conoce como "haplosuficiencia".

Los ARNip (ARN de interferencia pequeño) son pequeñas secuencias de ARN complementarias a secuencias específicas de ARN mensajero (ARNm), que inducen su degradación (1). En un trabajo anterior, los inventores de la presente invención conjeturaron la utilización de ARNip específicos de mutación para silenciar la expresión del alelo mutado de la proteína que provoca ADO2 dependiente de *CLCN7* (10). Aunque algunos ARNip demostraron poder bloquear, hasta cierto punto, la expresión de alelos mutados, su selectividad por el alelo mutado y capacidad para distinguir entre alelo mutado y alelo de tipo natural (WT) sigue siendo un desafío abierto.

El alcance de la presente invención es dar a conocer ARNip novedosos optimizados para el tratamiento de la enfermedad ADO2 dependiente de *CLCN7*.

### Características de la invención

La presente invención objeto de la presente solicitud se basa en la determinación, llevada a cabo por los inventores de la presente invención, de que la complementariedad, aunque sea total, con respecto a la secuencia de ARNm que comprende la mutación puntual no es por sí sola suficiente para obtener ARNip eficaces y selectivos; es decir, un ARNip eficaz en el silenciamiento de la expresión de la proteína mutada pero inactivo sobre la expresión de la proteína WT.

Por el contrario, la combinación óptima de eficacia y selectividad depende de varios factores, tales como la propia

mutación en el ARNm, la longitud de las secuencias que flanquean a la mutación, por tanto la posición del nucleótido mutado en la secuencia de ARNip, la presencia o ausencia de una o varias correspondencias erróneas de nucleótidos en comparación con la secuencia WT del ARNm y la posición de dicha correspondencia errónea en la secuencia de ARNip: en resumen, desde el diseño hasta la propia secuencia del ARNip.

Por tanto, un primer objetivo de la presente solicitud son ARN de interferencia pequeños (ARNip) y sus derivados o sus precursores complementarios a la región que comprende una mutación puntual en el ARN mensajero (ARNm) del gen humano mutado *CLCN7*. Los ARNip objetivo de la solicitud están caracterizados por que (i) dichas mutaciones reflejan mutaciones correspondientes de la proteína CIC-7: Y99C, D145G, W179X, G203D, L213F, L213F, L213F, G215R, P249L, R286W, R286Q, P470Q, R409W, L490F, G677V, 688del, K689E, R762L, G765B, L766P, R767W, A788D; que (ii) los ARNip tienen una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de 15 a 25 nucleótidos, que comprende la mutación puntual; que (iii) el ARNip reduce selectivamente la expresión de proteínas CIC-7 mutadas y que (iv) la proporción de eficacia del ARNip de la presente invención en la reducción de la expresión de proteína CIC-7 mutada en comparación con la proteína normal es mayor que uno.

Opcionalmente, la secuencia del ARN de interferencia pequeño (ARNip) de la presente invención comprende, además del nucleótido mutado, una o varias correspondencias erróneas de nucleótidos en comparación con la secuencia diana correspondiente del ARNm que contiene la mutación. Opcionalmente, la secuencia del ARN de interferencia pequeño (ARNip) de la presente invención comprende asimismo una secuencia cohesiva corta en el extremo 3', que consiste en los nucleótidos dA y dT. Un segundo objetivo de la presente invención está representado por el ARNip indicado anteriormente para su utilización en un tratamiento terapéutico, específicamente en el tratamiento terapéutico de ADO2 provocada por una mutación del gen *CLCN7*.

Un tercer objetivo de la presente invención es un procedimiento para la preparación de los ARNip dados a conocer anteriormente.

Un cuarto objetivo de la presente invención está representado por composiciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, uno o varios ARNip y un excipiente farmacológicamente aceptable. Tales composiciones son, preferentemente, para administración parenteral. Un objetivo adicional de la presente invención está representado por las mismas composiciones para su utilización en el tratamiento terapéutico de ADO2, asimismo en asociación con un segundo principio activo.

El ARNip, según la presente invención, diseñado y sometido a prueba en células aisladas y en un modelo animal, demostró una alta especificidad por el gen mutado. Eliminan selectivamente hasta el 95 % del transcrito del gen mutado, creando una situación, similar a la haplosuficiencia, que restaura la función de osteoclastos y aborda los síntomas de la enfermedad. El ARNip de la presente invención proporciona además las ventajas adicionales de internalizarse por células osteoclasticas mediante simple incubación, sin necesidad de ningún agente de transfección, y de permanecer en la célula durante mucho tiempo.

#### Descripción de las figuras

Figura 1 - Esquema de construcción de WT-*CLCN7*, obtenida clonando la secuencia completa de ADNc de *CLCN7* humano en el vector de expresión pEGFP-C1, mediante enzimas de restricción HindIII y XhoI.

Figura 2 - Secuencias de construcción comprobadas mediante secuenciación de ADN directa. Las secuencias estándar se notifican en la fila superior, el nucleótido mutado se muestra en la fila de abajo; los números que preceden y siguen a cada secuencia indican la posición de la misma dentro del ADNc derivado a partir de ARNm para el gen *CLCN7* humano ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_001114331.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001114331.2)).

Figura 3 - Se transfectaron células HEK293 con vector vacío o con vector WT-, p.R767W-, p.G215R-, p.R286W- y p.A788D-EGFP. Se cuantificó la expresión relativa de *CLCN7* mediante RT-PCR en tiempo real. Media  $\pm$  e.e. normalizada para *GAPDH* \* $p < 0,000001$  frente a células transfectadas con plásmido de EGFP vacío (prueba de la t de Student).

Figura 4 - Se transfectaron células HEK293 con vectores que portaban construcciones WT-EGFP, p.R767W-EGFP y p.G215R-EGFP, después se detectó la expresión y la ubicación de la proteína de fusión fluorescente EGFP mediante microscopía confocal junto con la expresión de marcadores del aparato de Golgi (gamma-adaptina), endosomas tempranos (EEA1), vesículas de ácidos (Lysotracker Red) y lisosomas (lamp-1). En los paneles "fusión" se muestra la ubicación conjunta de la proteína de fusión EGFP con los marcadores indicados. Aumento de lente de objetivo = 63X. Se obtuvieron asimismo resultados similares para las mutaciones p.A788D y p.R286W (no mostrado).

Figura 5 - Se transfectaron células RAW264.7 con vector EGFP vacío o con vector p.R767W-EGFP y se diferenciaron para dar osteoclastos en secciones de hueso bovino, mediante tratamiento con RANKL 100 ng/ml. Después se sonicaron las secciones para retirar células y se evaluaron para detectar la formación de lagunas de resorción (fosas) (índice de fosas) tras teñir con azul de toluidina al 0,1 %. Media  $\pm$  e.e. \* $p < 0,05$  frente a células transfectadas con vector EGFP vacío (prueba de la t de Student).

Figura 6 - Se diferenciaron osteoclastos humanos a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano, mediante incubación durante 14 días con M-CSF 20 ng/ml y RANKL 30 ng/ml. Se transfectaron las células con vector WT-EGFP mediante el procedimiento de AMAXA. Tras 2 días, se detectó la fluorescencia de la

proteína de fusión EGFP mediante microscopía confocal. En los paneles “fusión” se muestra la ubicación conjunta corregida con los marcadores indicados para el aparato de Golgi (gamma-adaptina), endosomas tempranos (EEA-1), vesículas de ácidos (Lysotracker Red) y lisosomas (lamp-1). Aumento de lente de objetivo = 63X.

Figura 7 - Células HEK293 transfectadas con vectores WT o que portan la mutación p.R767W del gen *CLCN7* y tratadas con ARNip reorganizado al azar de control o con concentraciones crecientes de ARNip de p.R767W 1 durante 48 horas. Al final de la incubación, se extrajo el ARN y se evaluó la expresión del transcrito de *CLCN7* mediante RT-PCR en tiempo real. Media  $\pm$  e.e. normalizada para *GAPDH*, expresada como porcentaje a lo largo del tratamiento con ARNip reorganizado al azar (punto 0 en el eje de las X). \* $p < 0,05$  frente a células transfectadas con p.R767W- y WT-EGFP tratadas con ARNip de control (SCR, reorganizado al azar) (prueba de la t de Student).

Figura 8 - Se transfectaron células RAW264.7 con vector vacío o con vectores WT- o p.R767W-EGFP, se diferenciaron para dar osteoclastos en secciones de hueso bovino y se trataron con ARNip de control (SCR), o con ARNip específico para el transcrito que porta la mutación p.R767W (ARN de p.R767W 1). La cuantificación de resorción ósea muestra la capacidad de ARNip de p.R767W 1 para mejorar la resorción ósea reducida por la construcción mutada (comparar barras de color negro y gris claro). En vez de eso, el ARNip de p.R767W 1 no modificó significativamente la resorción ósea en células transfectadas con vector WT-EGFP (comparar barras de color blanco y gris oscuro). Media  $\pm$  e.e. \* $p < 0,05$  frente a células transfectadas con vector EGFP vacío (prueba de la t de Student).

Figura 9 - Se trataron células HEK293, transfectadas con vectores WT- y p.R767W-EGFP, con ARNip reorganizado al azar de control o con concentraciones crecientes de los ARNip para p.R767W indicados en la figura (secuencias en la tabla 2) y se evaluaron para determinar la expresión de transcrito de *CLCN7* mediante RT-PCR en tiempo real. El ARNip de p.R767W 2C mostró una eficacia y especificidad mayores en comparación con los otros ARNip de p.R767W. Media  $\pm$  e.e. normalizada para *GAPDH*, expresada como porcentaje a lo largo del tratamiento con ARNip reorganizado al azar (punto 0 en el eje de las X). \* $p < 0,05$  frente a células transfectadas con p.R767W-EGFP y tratadas con ARNip de control (SCR, reorganizado al azar). # $p < 0,05$  frente a células transfectadas con vector WT-EGFP y tratadas con ARNip de control (SCR) (prueba de la t de Student).

Figura 10 - (A) Se diferenciaron osteoclastos humanos a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano y se incubaron con ARNip de Cy3-*CLCN7* WT 300 nM durante 48 horas. Después se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % y se detectó la fluorescencia de Cy3 dentro de los osteoclastos mediante microscopía confocal. Aumento de lente de objetivo = 63X. (B, C) Se transfectaron osteoclastos humanos con vector vacío o con vector p.R767W-EGFP. Se trataron osteoclastos transfectados con vector p.R767W-EGFP durante 48 horas con ARNip de control (SCR) o ARNip de p.R767W 2C (tabla 2) a las concentraciones indicadas. Tras 48 horas, se analizaron la expresión (B) del transcrito de EGFP normalizada para *GAPDH*, y (C) la resorción ósea, respectivamente mediante RT-PCR en tiempo real y ensayo de fosas. Media  $\pm$  e.e. # $p < 0,005$  frente a osteoclastos transfectados con p.R767W-EGFP y tratados con ARNip de control (SCR). \* $p < 0,05$  frente a osteoclastos transfectados con vector EGFP vacío (prueba de la t de Student).

Figura 11 - Se diferenciaron osteoclastos humanos a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano y se trataron durante 48 horas con las concentraciones de ARNip WT o ARNip de p.R767W 2C indicadas en la figura. Se extrajo ARN y se sometió a RT-PCR. Cabe destacar la ausencia de efecto de ARNip de p.R767W 2C sobre la expresión de transcrito de *CLCN7* normal (normalizada para *GAPDH*).

Figura 12 - Se diferenciaron osteoclastos humanos a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano, se sembraron en placa en secciones de hueso, se incubaron y se trataron durante 48 horas con ARNip reorganizado al azar o con las concentraciones indicadas de ARNip de p.R767W 2C. Después se cuantificó la resorción ósea mediante ensayo de fosas. Media  $\pm$  e.e. expresada como porcentaje a lo largo del tratamiento con ARNip reorganizado al azar (punto 0 en el eje de las X). Cabe destacar la ausencia de un efecto estadísticamente significativo en la formación de fosas de resorción mediante el tratamiento con ARNip de p.R767W 2C (prueba de la t de Student).

Figura 13 - Se transfectaron (A) células HEK293 y (B) osteoclastos humanos primarios con vectores WT- o p.G215R-EGFP y se trataron durante 48 horas con 100 nM de ARNip de control (SCR, reorganizado al azar), o de ARNip específico de p.G215R-EGFP (p.G215R). Se evaluó la expresión de ARNm de *CLCN7* mediante RT-PCR en tiempo real, utilizando cebadores específicos para *CLCN7*, para células HEK239 (que no expresan el gen *CLCN7* endógeno), y para *EGFP* para osteoclastos humanos (para distinguir el gen *CLCN7* exógeno mutado del endógeno normal). Media  $\pm$  e.e. normalizada con *GAPDH* (prueba de la t de Student).

Figura 14 - Se sembraron en placa osteoclastos primarios, generados a partir de las células mononucleares de médula ósea de ratones WT- y p.G213R-*clcn7* ADO2 (p.G213R KI) mediante incubación con M-CSF 50 ng/ml y RANKL 120 ng/ml, en secciones de hueso y se trataron durante 7 días con ARNip de control (SCR), o ARNip específico de p.G213R-*clcn7* (p.G213R), a la concentración de 100 nM. Al final de la incubación, se retiraron las células mediante sonicación, se tiñeron las secciones con azul de toluidina al 0,1 % y se evaluó la resorción ósea mediante ensayo de fosas. Media  $\pm$  e.e. \* $p = 0,0001$  frente a WT, # $p = 0,003$  frente a p.G213R KI (prueba de la t de Student).

Figura 15 - Se trataron ratones CD1 de 1 mes de edad con ARNip reorganizado al azar de control o con 2 mg/kg de peso corporal de ARNip de *clcn7* mediante kit de administración hidrodinámica *TransIT-QR*. Tras 24 y 48 horas, se sacrificaron los animales y se extrajo ARN a partir de riñón, cerebro, hígado, pulmón, corazón, bazo y tibia. Se analizaron los niveles de transcripción del gen *clcn7* mediante RT-PCR en tiempo real, se normalizaron para *gapdh* y se expresaron como porcentaje a lo largo del tratamiento con ARNip reorganizado al azar (punto 0 en el eje de las X).

Figura 16 - (A) RT-PCR utilizando cebadores específicos para el ARNm de p.G213R (Fw: CAAGTGCTTCCTCAATG

(SEQ ID NO: 32); Rv: GCCCTCTTCCAAGCTAAA (SEQ ID NO: 33)) que muestra amplificación de transcrito únicamente en osteoclastos primarios de ratones p.G213R KI heterocigóticos y homocigóticos, mientras que en los osteoclastos de tipo natural (WT) no aparece ningún transcrito amplificado. (B) Secuenciación de ADN directa del transcrito amplificado mostrado en la figura (A) en osteoclastos p.G213R/WT heterocigóticos, demostrando únicamente la secuencia mutada.

**Figura 17** - Se trataron osteoclastos generados a partir de células mononucleares de médula ósea de ratones WT y p.G213R KI con la concentración indicada de ARNip de control (SCR) o ARNip específico de p.G213R-*clcn7*. Se realizó RT-PCR en tiempo real utilizando los cebadores específicos para el transcrito mutado indicado en la figura 14. Media  $\pm$  e.e. (prueba de la t de Student).

**Figura 18** - Ratones p.G213R KI de tres meses de edad recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de 4 mg/kg de ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI® (conjugado) y se sacrificaron en los puntos temporales indicados. Se extrajeron sueros y se evaluaron para determinar los niveles de ARN total mediante Nanodrop. Media  $\pm$  e.e. (ANOVA).

**Figura 19** - Ratones p.G213R KI de diez días de edad recibieron una inyección i.p. de 4 mg/kg de conjugado de ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI®, 3 veces por semana durante 4 semanas. Al final del experimento se sacrificaron los ratones, se extrajo ARN a partir de los órganos indicados en la figura y se sometió a RT-PCR, utilizando cebadores específicos para el transcrito mutante indicado en la figura 14, normalizado con *gadh*. Media  $\pm$  e.e. (prueba de la t de Student).

**Figura 20** - Se sometieron ratones p.G213R ADO2 a inyección i.p. con ARNip de control (SCR, reorganizado al azar) o ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI (p.G213R), a las dosis indicadas en el eje de las X. Tras 48 horas, se extirparon las tibias, se extrajo ARN y se evaluaron los niveles de ARNm mutado de p.G213R-*clcn7* mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el par de cebadores específicos para la secuencia mutada indicada en la figura 14. Media  $\pm$  e.e. normalizada para GAPDH.

**Figura 21** - Ratones p.G213R KI recibieron inyecciones i.p. de 4 mg/kg de ARNip SCR o ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI, 3 veces por semana durante 4 semanas. Al final del experimento, se sacrificaron los ratones y se sometieron a evaluación histopatológica de los órganos indicados en la figura mediante tinción con hematoxilina/eosina (barra = 100  $\mu$ m para bazo y riñón, 20  $\mu$ m para hígado).

**Figura 22** - Se extrajeron sueros a partir de los ratones descritos en la figura 20 y se analizaron mediante el procedimiento de Refloton para detectar los biomarcadores de funciones renal (ácido úrico) y hepática [transaminasa glutámico oxaloacética (GOT)], y para detectar el biomarcador de ADO2 creatina cinasa (CK). Los valores normales están comprendidos entre las líneas discontinuas. Media  $\pm$  e.e. (prueba de la t de Student).

**Figura 23** - Ratones WT y p.G213R KI recibieron inyecciones i.p. de 4 mg/kg de ARNip SCR o ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI, 3 veces por semana durante 2 y 4 semanas. Al final del experimento, se sacrificaron los ratones y se extrajeron sueros para evaluar los niveles de biomarcadores osteoclasto (isoforma 5b de enzima TRAcP) y de resorción ósea (CTX) y para calcular la proporción de CTX/TRAcP.

**Figura 24** - Análisis del fenotipo óseo de ratones tratados durante 2 semanas tal como se indica en la figura 22. (A) Análisis por  $\mu$ TC de la región proximal de la tibia. (B) Volumen de hueso trabecular con respecto a volumen de tejido total (BV/TV), (C) Número trabecular (Th.N). (E) Grosor trabecular (Tb.Th). (F) Separación trabecular (Tb.Sp). Media  $\pm$  d.e. de 4-7 ratones/grupo (prueba de la t de Student).

**Figura 25** - Ratones WT y p.G213R KI de diez días de edad recibieron inyecciones i.p. de 4 mg/kg de ARNip SCR o de ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI, 3 veces por semana durante 4 semanas. Al final del experimento se sacrificaron los ratones y se analizó su fenotipo óseo. (A)  $\mu$ TC de la región proximal de la tibia. (B) Volumen de hueso trabecular con respecto a volumen de tejido total (BV/TV). (C) Número trabecular (Tb.N). (D) Grosor trabecular (Tb.Th). (E) Separación trabecular (Tb.Sp). (F) Concentración en suero de hormona paratiroidea (PTH).

**Figura 26** - Análisis de fenotipo osteoclasto en ratones descritos en la figura 24. (A) Tinción de enzima TRAcP histoquímica para destacar osteoclastos (células moradas). Barra = 100  $\mu$ m. (B) Superficie de osteoclastos con respecto a superficie de hueso (Oc.S/BS). (C) Número de osteoclastos con respecto a perímetro de hueso (Oc.N/B Pm). (D) Expresión transcripcional, mediante RT-PCR en tiempo real con ARN extraído a partir de los fémures, de genes de osteoclastos [*Tracp* y *Catepsina K (CatK)*] y de osteoblastos [*fosfatasa alcalina (ALP)* y *factor de transcripción relacionado con Runt 2 (Runx 2)*] normalizada con *gadh*. (E) Superficie erosionada por osteoclastos con respecto a superficie de hueso total (ES/BS). Media  $\pm$  d.e. (prueba de la t de Student).

**Figura 27** - Análisis de parámetros corticales, cartilaginosos y osteoblásticos en ratones descritos en la figura 24. (A) Grosor de hueso cortical (Cor.Th). (B) Grosor de placa de crecimiento (anchura). (C) Superficie de osteoblastos con respecto a superficie de hueso (Ob.S/BS). (D) Imágenes histológicas de osteoide (flechas). Barra = 5  $\mu$ m. (E) Volumen de osteoide con respecto a volumen de hueso (OV/BV). (F) Marcación con calceína (fluorescencia verde) de deposición mineral (flechas dobles). Barra = 2  $\mu$ m. (G) Tasa de aposición mineral (MAR). (H) Superficie mineralizada con respecto a superficie de hueso (MS/BS). (I) Tasa de formación ósea (BFR).

**Figura 28** - Análisis de la calidad ósea mediante indentación en ratones descritos en la figura 25. (A) Distancia de indentación total (TID). (B) Distancia de indentación de primer ciclo (ID). (C) Distancia de contacto (TDD). Media  $\pm$  d.e. de 3-7 ratones/grupo. (prueba de la t de Student).

**Figura 29** - Se transfectaron osteoclastos humanos con los vectores de expresión indicados en la figura y se trataron durante 48 horas con las concentraciones, indicadas en el eje de las X, de ARNip específicos para (A) p.G213R-, (B) p.R767R- y (C) p.R286W-EGFP. RT-PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos para EGFP, normalizada con GAPDH. (D) Se generaron osteoclastos a partir de células mononucleares de sangre de un paciente con ADO2 que portaba la mutación p.G215R, se cultivaron en secciones de hueso bovino y se trataron con

la concentración indicada de ARNip SCR y ARNip de p.G215R. Al final del experimento, se retiraron las células mediante sonicación y se evaluó la resorción ósea midiendo las fosas de resorción. Resultados de un único experimento sin repeticiones.

- 5 **Figura 30** - (A) Se transfectaron células de cáncer de mama humanas MDA-MB-231 (MDA) con vectores WT- o p.R767W-EGFP y se trataron durante 48 horas con ARNip reorganizado al azar de control o con ARNip de p.R767W 2C a las concentraciones indicadas en el eje de las X. El gráfico muestra los resultados de la expresión de EGFP conjugado con gen *CLCN7* transfectado, analizados mediante RT-PCR en tiempo real realizada utilizando un par de cebadores específicos para EGFP normalizados para GAPDH. Media  $\pm$  e.e. expresada como porcentaje a lo largo de tratamiento con ARNip reorganizado al azar (punto 0 en el eje de las X).  $p=0,02$  (prueba estadística: área bajo la curva). (B) Se obtuvieron xenotumores mediante inyección subcutánea de células de cáncer de mama humanas, MDA-MB-231, transfectadas con vector p.R767W-EGFP, en los costados de ratones atímicos (inmunocomprometidos) Balb/c *nu/nu*. Cuando los tumores alcanzaron el volumen de 1 cm<sup>3</sup>, se trataron los ratones una vez durante 96 horas con vehículo (jetPEI) o 4 mg/kg de peso corporal de ARNip de control (SCR, reorganizado al azar), ARNip WT o ARNip de R767W 2C complejo con jetPEI. Después se realizaron RT-PCR en tiempo real con ARN extraído a partir de los tumores, utilizando un par de cebadores específicos para EGFP. Media  $\pm$  e.e. normalizada para GAPDH.  $p=0,02$  (prueba de la t de Student).

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 20 Se sabe que el ARNm del gen *CLCN7* humano puede comprender mutaciones, las patógenas en ADO2, que generan proteínas mutadas tal como se indica en la tabla 1.

**Tabla 1**

	Mutación y posición en la proteína	Sustitución de aminoácido	Otra mutación
1	Y99C	Tirosina/cisteína	
2	D145G	Ácido aspártico/glicina	
3	W179X	Triptófano/desconocido	
4	G203D	Glicina/ácido aspártico	
5	L213F	Leucina/fenilalanina	
6	G215R	Glicina/arginina	
7	P249L	Prolina/leucina	
8	R286W	Arginina/triptófano	
10	R286Q	Arginina/glutamina	
11	P470Q	Prolina/glutamina	
12	R409W	Arginina/triptófano	
13	L490F	Leucina/fenilalanina	
14	G677V	Glicina/valina	
15	688del	-	Delección de aminoácido en la posición 688 de la proteína
16	K689E	Lisina/ácido glutámico	
17	R762L	Arginina/leucina	
18	G765B	Glicina/	
19	L766P	Leucina/prolina	
20	R767W	Arginina/triptófano	
21	A788D	Alanina/ácido aspártico	
22	2423delAG	-	Delección de adenina/guanina en la posición 2423 del ADN

- 25 Otras posibles mutaciones del gen *CLCN7* que pueden dar como resultado posibles muteínas a partir de la proteína CIC-7 y otros tantos ARNip, según la presente invención, son las siguientes: R223L, R223P, R223G, R223K, R223W, R223I, R223M, R223C, R223S, R265L, R265P, R265G, R265K, R265W, R265I, R265M, R265C, R265S, R271L, R271P, R271G, R271K, R271W, R271I, R271M, R271C, R271S, R280L, R280P, R280G, R280K, R280W, R280I, R280M, R280C, R280S, R281L, R281P, R281G, R281K, R281W, R281I, R281M, R281C, R281S, R286L, R286P, R286G, R286K, R286I, R286M, R286C, R286S, R326L, R326P, R326G, R326K, R326W, R326I, R326M, R326C, R326S, R362L, R362P, R362G, R362K, R362W, R362I, R362M, R362C, R361S, R403L, R403P, R403G, R403K, R403W, R403I, R403M, R403C, R403S, R405L, R405P, R405G, R405K, R405W, R405I, R405M, R405C, R405S, R409L, R409P, R409G, R409K, R409W, R409I, R409M, R409C, R409S, R436L, R436P, R436G, R436K,

R436W, R436I, R436M, R436C, R436S, R526L, R526P, R526G, R526K, R526W, R526I, R526M, R526C, R526S, C211F, C211S, C211Y, C211R, C211G, C211W, C411F, C411S, C411Y, C411R, C411G, C411W, C438F, C438S, C438Y, C438R, C438G, C438W, W541R, W541S, W541L, W541G, W616R, W616S, W616L, W616G, L224S, L224P, L224W, L224H, L224Q, L224R, L224F, L224I, L224M, L224V, L224S, L224P, L224W, L224H, L224Q, L224R, L224F, L224I, L224M, L224V, L227S, L227P, L227W, L227H, L227Q, L227R, L227F, L227I, L227M, L227V, L564S, L564P, L564W, L564H, L564Q, L564R, L564F, L564I, L564M, L564V, S290Y, S290C, S290W, S290F, S290P, S290L, S290T, S290A, S290N, S365Y, S365C, S365W, S365F, S365P, S365L, S365T, S365A, S365N, S473Y, S473C, S473W, S473F, S473P, S473L, S473T, S473A, S473N, G241R, G241S, G241W, G241C, G241D, G241E, G241A, G241V, G347R, G347S, G347W, G347C, G347D, G347E, G347A, G347V, G361R, G361S, G361W, G361C, G361D, G361E, G361A, G361V.

### ARNip

Se diseñaron ARN de interferencia pequeños complementarios a la región que comprende una mutación puntual en el ARN mensajero (ARNm) del gen *CLCN7* humano y se produjeron para todas las mutaciones génicas, que se sabe que son patógenas para ADO2, notificadas en la tabla 1.

Los ARN de interferencia pequeños (ARNip) de la presente invención son secuencias de cadena doble (dúplex), de las que la primera se denomina "guía" (o antisentido) y la segunda "pasajera" (o sentido). La cadena guía (antisentido) es la complementaria al ARN diana que se va a inhibir, silenciar o degradar.

Dado que la secuencia de la cadena pasajera es complementaria a la cadena guía, para todos los ARNip de la presente invención indicados en la presente solicitud, sólo se notifica la secuencia de la cadena guía. Los ARNip de la presente invención tienen una secuencia que comprende o que consiste en un fragmento compuesto por de 15 a 29 nucleótidos, por ejemplo 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24, 25, 26, 27 o 28 que contiene la mutación puntual.

Los ARNip de la presente invención se seleccionan por su capacidad para unirse selectivamente al ARNm transcrito a partir de las formas de alelo mutadas del gen *CLCN7*, reduciendo o suprimiendo la expresión de proteína CIC-7 mutada. Gracias a su selectividad de silenciamiento del gen mutado, su eficacia en la reducción de la expresión es mayor para la proteína mutada que para la proteína normal. Por tanto, muestran una proporción de CIC-7 mutada/CIC-7 normal de eficacia mayor que uno.

Con el fin de potenciar adicionalmente la selectividad y/o especificidad de los ARNip frente a ARNm mutado, la secuencia de los ARNip puede comprender uno o varios nucleótidos no complementarios (correspondencia errónea) a dicha secuencia de ARN mutada. Con esta estrategia, se diseñaron ARNip novedosos (tabla 2). Diversos ARNip mostraron una especificidad significativamente mayor para ARNm mutado, en comparación con ARNm W.T. Con uno de ellos (denominado ARNip de p.R767W 2C), se obtuvo una eficacia del 90 % de reducción de ARNm mutado, sin ninguna reducción de ARNm WT (figura 9).

### Derivados de ARNip

Además, con el fin de aumentar la estabilidad de los mismos ARNip producidos y mejorar la eficiencia del efecto producido, se pueden modificar químicamente uno o varios nucleótidos que forman la secuencia de ARNip con el fin de obtener derivados del ARNip de la presente invención. Por tanto, todos los derivados descritos a continuación en el presente documento quedan abarcados por el alcance de protección de la presente solicitud.

En primer lugar, la secuencia de ARNip se puede dotar de una secuencia de dTdT o dAdT que sobresale en el extremo 3'. Esta última secuencia, además de proporcionar estabilidad y mejorar la eficiencia, induce la oligomerización de ARNip con el fin de imitar el ADN (ARNip cohesivo). Por tanto, se pueden asociar ARNip cohesivos con reactivos habituales que garantizan una distribución de ARNip eficiente *in vivo* y que disminuyen la capacidad de provocar respuestas inmunitarias mediadas por citocinas proinflamatorias e interferón: por ejemplo, el producto jetPEI®, que es un derivado de polietilenoimina lineal proporcionado por PolyPlus Transfection.

En los ensayos *in vivo* realizados en un modelo de ADO2 murino, sólo se utilizaron los conjugados de ARNip cohesivo/jetPEI. Sin embargo, los ARNip de la presente invención, no modificados o modificados de manera diferente, tal como se describe a continuación en el presente documento, se pueden utilizar igualmente de manera eficaz.

Otros derivados que mejoran la estabilidad de los ARNip de la presente invención en forma de dúplex son los derivados de 2'-alcoxilo (C1, C2, C3, C4), por ejemplo los derivados de 2'-metoxilo, (es decir derivados de 2'-OMe) (Denise M Kenski, Gabor Butora, Aaron T Willingham, Abby J Cooper, Wenlang Fu, Ning Qi, Ferdie Soriano, Ian W Davies y W Michael Flanagan. "siRNA-optimized Modifications for Enhanced *In Vivo* Activity". Molecular Therapy Nucleic Acids (2012) 1, e5; doi:10.1038/mtna.2011.4). Los derivados de 2'-OMe, normalmente presentes en ARNr y en ARNt, son derivados atóxicos del ARNip de la presente invención, en los que el grupo -OMe se inserta en la posición 2' del núcleo de ribosa en la cadena sentido o antisentido, o en ambas.

Asimismo, los derivados de 2'-flúor (es decir 2'-F) (Denise M. Kenski *et al.*, citado anteriormente) son compatibles con la función llevada a cabo por el ARNip de la presente invención y potencian la estabilidad del dúplex del mismo frente a la degradación por nucleasa. La incorporación de flúor en la posición 2' del núcleo de ribosa mantiene la actividad de los ARNip tanto *in vitro* como *in vivo*, aumentando su estabilidad. La utilización combinada de 2'-F en nucleótidos de pirimidina con 2'-OMe en nucleótidos de purina da como resultado un ARNip de dúplex con estabilidad en suero extrema y eficacia mejorada notablemente.

Los derivados ARN de 2'-O-(2-metoxietil) (MOE-ARN) (Mark A. Behlke. "Chemical Modification of siRNAs for *In vivo* Use". Oligonucleotides 18:305-320 (2008)) se pueden utilizar igualmente para potenciar la estabilidad del ARNip de la presente invención. Con frecuencia se utilizan grupos MOE en oligonucleótidos antisentido para dar al oligonucleótido una alta resistencia frente a nucleasas y aumentar la Tf.

Otros derivados de ARNip, que tienen una función y estabilidad mejoradas, adecuados para la presente invención, son los derivados de 2'-O-bencilo y los derivados de 2'-O-metil-4-piridina (ver Denise M. Kenski *et al.*, citado anteriormente), 2'-amino (2'-NH), 2'-aminoetilo (2'-AE), 2'-guanidinopropilo (2'-GP).

Son particularmente interesantes para los fines de la presente invención, debido a su estabilidad, los derivados de ANB (ácidos nucleicos bloqueados) de ARNip (ver Mark A. Behlke, citado anteriormente). Tal como conoce bien un experto en la materia, estos derivados se caracterizan por un puente de metileno entre posiciones de ribosa 2'-O y 4'-C. El puente de metileno bloquea la unidad de sacárido en la configuración 3'-endo, proporcionando así un aumento de Tf significativo y resistencia frente a nucleasas.

### Precusores

En una realización específica de la presente invención, los ARNip o derivados de los mismos se pueden utilizar en forma de sus precursores *in vivo*. Estos últimos son asimismo un objetivo de la presente invención.

A modo de ejemplo, se pueden sustituir los ARNip por el ARNhp (ARN de horquilla pequeña) correspondiente, en particular en el alcance de la terapia génica. Tal como conoce bien un experto en la materia, los ARNhp son secuencias o transcritos de ARN cortos, que consisten en una estructura de cadena doble formada mediante el acoplamiento de dos secuencias complementarias de aproximadamente 15-29 nucleótidos cada una, normalmente 19-25 o 15-20, unidas mediante un bucle de aproximadamente 2-10 nucleótidos, por ejemplo 4-9 o 5-6 nucleótidos. Cuando se introducen y se expresan en la célula, los transcritos de formación de ARNhp se procesan por el complejo enzimático DICER, que, cortando la secuencia de bucle, convierte, directamente en la célula, los ARNhp en los ARNip correspondientes. Entonces estos últimos llevarán a cabo su función de desactivación o silenciamiento de genes diana. Por tanto, dentro del alcance de la terapia génica, los ARNip de la presente invención se pueden sustituir por los ARNhp correspondientes.

Todos los derivados y precursores descritos anteriormente están abarcados dentro del alcance de protección de la presente solicitud.

Dentro del alcance del presente trabajo, se diseñaron y se produjeron diversos ARNip específicos para el ARNm de alelos del gen *CLCN7* humano que contienen las mutaciones indicadas en la tabla 1, o la mutación de gen murino p.G213R. Después, se analizó la eficacia de los fragmentos de ARN individuales notificados a continuación en el presente documento en la inhibición de la expresión de proteína CLC7-WT en comparación con proteínas mutadas en las posiciones: p.G215R, p.R767W, p.R286W, p.A788D.

UUCCUCAAUAGGGUGAAGA (SEQ ID NO: 1)  
 UUCCUCAAUAGGGUGGAGA (SEQ ID NO: 2)  
 50 UUCCUCAAUAGGGUUAAGA (SEQ ID NO: 3)  
 UUCCUCAAUAGGUGAAGG (SEQ ID NO: 4)  
 UUCCUCAAUAGUGUGAAGA (SEQ ID NO: 5)  
 UUCCUCAAUAGGGUGACGA (SEQ ID NO: 6)  
 UUCCUCAACAGGGUGAAUA (SEQ ID NO: 7)  
 55 CAACAGAGUGAAGAUC CCC (SEQ ID NO: 8)  
 UUCCUCAACAGGGUGAAGA (SEQ ID NO: 9)  
 CUCAACAGGGUGAAGAUC (SEQ ID NO: 10)  
 CAACAGGGUGAAGAUC CCC (SEQ ID NO: 11)  
 AACAGGUUGAAGAUC CCC (SEQ ID NO: 12)  
 60 AACAGGGUGAAGAUC CCC (SEQ ID NO: 13)  
 CCUGGGCCUGUGGCACCU (SEQ ID NO: 14)  
 CCUGGGCCUGUGGCACCUU (SEQ ID NO: 15)  
 CCUGGGCCUGUGGC GCCUG (SEQ ID NO: 16)  
 CCUGGGCCUGUGGCAUCUG (SEQ ID NO: 17)  
 65 ACAGAGAAGUGGGACUUCG (SEQ ID NO: 18)  
 ACAGAGAAGUGGGACUUCU (SEQ ID NO: 19)



- ACAGAGAAGUGGGGCUUCG (SEQ ID NO: 20)  
 ACAGAGAAGUGGGAUUUCG (SEQ ID NO: 21)  
 AGGACCUCGACAGGUACCG (SEQ ID NO: 22)  
 AGGACCUCGACAGGUACCU (SEQ ID NO: 23)  
 5 AGGACCUCGACAGUUACCG (SEQ ID NO: 24)  
 AGGACCUCGACAGGCACCG (SEQ ID NO: 25)  
 AGGACCUCGACUGGUACCG (SEQ ID NO: 26)  
 AGGACCUCGACAGGUAACG (SEQ ID NO: 27)  
 AGGACCUCGACAGGUCCCG (SEQ ID NO: 28)  
 10 GGAACUCGACAGGUACCG (SEQ ID NO: 29)

En el trabajo experimental descrito en la presente solicitud, todas las secuencias de ARNip notificadas anteriormente se equiparon con una secuencia de dTdT que sobresalía en el extremo 3' para mejorar su estabilidad y eficacia. Para su utilización *in vivo*, se sustituye la secuencia de dTdT por la secuencia de dAdT, que mejora adicionalmente la estabilidad y eficacia de la misma y permite la unión de la misma a cualquier vehículo permitiendo una distribución *in vivo* mejorada del ARNip y reduciendo cualquier respuesta inmunitaria.

Los resultados obtenidos con los ARNip sometidos a ensayo *in vitro*, en cuanto a su eficacia sobre ARNm WT o sobre ARNm mutado, se indican en la tabla 2 a continuación.

20

Tabla 2

Mutación	Nombre de ARNip	Número de correspondencias erróneas frente a tipo natural	Secuencia sentido 5'	Eficacia frente a tipo natural	Eficacia frente a mutante
p.G215R	G215R 1M	2	UUCCUCAAU <u>A</u> GGGUGAAGA- dTdT 3'	+	0
	G215R 2A	3	UUCCUCAAU <u>A</u> GGGUGGAGA- dTdT 3'	+	0
	G215R 2B	3	UUCCUCAAU <u>A</u> GGGUUAAGA- dTdT 3'	++	0
	G215R 2C	3	UUCCUCAAU <u>A</u> GGUGAAGG-dTdT 3'	+++	0
	G215R 2D	3	UUCCUCAAU <u>A</u> GUGUGAAGA- dTdT 3'	0	ND*
	G215R 2E	3	UUCCUCAAU <u>A</u> GGGUGACGA- dTdT 3'	0	ND*
	G215R 2F	2	UUCCUCAAC <u>A</u> GGGUGAAUA- dTdT 3'	++	+
	G215R 2G	2	CAAC <u>A</u> GAGUGAAGAUCCCC- dTdT 3'	++	++
	G215R 2H	1	UUCCUCAAC <u>A</u> GGGUGAAGA- dTdT 3'	+	+
	G215R 2I	1	CUCAAC <u>A</u> GGGUGAAGAUC- dTdT 3'	++	+
	G215R 2L	1	CAAC <u>A</u> GGGUGAAGAUCCCC- dTdT 3'	+	++
	G215R 2N	2	AAC <u>A</u> GGUUGAAGAUCCCC- dTdT 3'	++	+
	<b>G215R 2M</b>	<b>1</b>	AAC <u>A</u> GGGUGAAGAUCCCC- dTdT 3'	<b>0</b>	<b>+++</b>
	p.R767W	R767W 1	1	CCUGGGCCUG <u>U</u> GGCACCUG- dTdT 3'	++

Mutación	Nombre de ARNip	Número de correspondencias erróneas frente a tipo natural	Secuencia sentido 5'	Eficacia frente a tipo natural	Eficacia frente a mutante
	R767W 2A	2	CCUGGGCCUG <u>U</u> GGCACCUU- dTdT 3'	+	++
	R767W 2B	2	CCUGGGCCUG <u>U</u> GGCGCCUG- dTdT 3'	+	+++
	<b>R767W 2C</b>	2	CCUGGGCCUG <u>U</u> GGCAUCUG- dTdT 3'	<b>0</b>	<b>++++</b>
p.R286W	R286W 1	1	ACAGAGAAG <u>U</u> GGGACUUCG- dTdT 3'	+++	++
	R286W 2A	2	ACAGAGAAG <u>U</u> GGGACUUCU- dTdT 3'	+	++
	R286W 2B	2	ACAGAGAAG <u>U</u> GGGGCUUCG- dTdT 3'	0	++
	<b>R286W 2C</b>	2	ACAGAGAAG <u>U</u> GGGAUUUCG- dTdT 3'	<b>+</b>	<b>++++</b>
p.A788D	A788D 1	1	AGGACCUCG <u>A</u> CAGGUACCG- dTdT 3'	++++	+++
	A788D 2A	2	AGGACCUCG <u>A</u> CAGGUACCU- dTdT 3'	++++	+++
	A788D 2B	2	AGGACCUCG <u>A</u> CAGUUACCG- dTdT 3'	++++	+++
	A788D 2C	2	AGGACCUCG <u>A</u> CAGGCACCG- dTdT 3'	++++	+++
	A788D 2D	2	AGGACCUCG <u>A</u> CUGGUACCG- dTdT 3'	++++	++
	A788D 2E	2	AGGACCUCG <u>A</u> CAGGUAACG- dTdT 3'	++++	++
	A788D 2F	2	AGGACCUCG <u>A</u> CAGGUCCCG- dTdT 3'	0	0
	A788D 2G	2	GGA <u>A</u> CUCG <u>A</u> CAGGUACCGC- dTdT 3'	0	+

Las secuencias de los ARNip utilizados en el estudio *in vitro* notifican en **negrita y subrayado** el nucleótido mutante (con respecto a la secuencia humana [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_001114331.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001114331.2)) y en **negrita y cursiva** el/los nucleótido(s) de correspondencia errónea adicional(es). Los ARNip indicados en negrita en la segunda columna son los que se consideran más eficaces y específicos. Los ensayos se realizaron en células HEK293 humanas, aparte de los ARNip marcados con (\*), sometidos a ensayo exclusivamente en osteoclastos WT humanos, cuya eficacia sobre el transcrito correspondiente no se determinó (ND). Asimismo, se produjo un ARNip que reconocía el ARNm del gen *CLCN7* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_011930.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_011930.3)), mutado en la posición 213 de la proteína de ratón (p.G213R) (correspondiente a la mutación p.G215R en seres humanos) tal como se indica en la tabla 3.

Tabla 3

ARNip	Nombre de ARNip	Número de correspondencias erróneas frente a tipo natural	Secuencia sentido 5'
p.G213 R	p.G213R- <i>clcn7</i>	2	AAC <u>A</u> GGGUGAAGAUC <del>CCCC</del> CdAdT3' (SEQ ID NO: 30)
WT	<i>clcn7</i>	0	AAUGGGGUGAAGAUC <del>CCCC</del> CdAdT3' (SEQ ID NO: 31)

Secuencia de ARNip para el gen p.G213R-*clcn7* y para el gen normal (*clcn7*) que se va a utilizar *in vivo*. **Negrita y**

**subrayado** = nucleótido mutante; **negrita y cursiva** = nucleótido de correspondencia errónea.

Los ARNip preferentes de la presente invención son:

- 5 CAAC**A**GGGUGAAGAUCCCC (SEQ ID NO: 11)  
 AAC**A**GGGUGAAGAUCCCC (SEQ ID NO: 13)  
 CCUGGGCCUG**U**GGCACCUU (SEQ ID NO: 15)  
 CCUGGGCCUG**U**GGC**G**CCUG (SEQ ID NO: 16)  
 CCUGGGCCUG**U**GGCA**U**CUG (SEQ ID NO: 17)  
 10 ACAGAGAAG**U**GGGACUUCU (SEQ ID NO: 19)  
 ACAGAGAAG**U**GGGGCUUCG (SEQ ID NO: 20)  
 ACAGAGAAG**U**GGGA**U**UUCG (SEQ ID NO: 21)  
 GGA**A**CUCG**A**CAGGUACCGC (SEQ ID NO: 29)]

- 15 En una realización preferente de la presente invención, se dotan todos los ARNip indicados anteriormente, para su utilización *in vivo*, de la secuencia de *dAdT* corta que sobresale en el extremo 3'.

### Procedimiento para la preparación de los ARNip

- 20 Un experto en la materia conoce procedimientos de síntesis de nucleótidos para la preparación de secuencias de ARN cortas y se describen en el estado de la técnica anterior. Los ARNip de la presente invención se produjeron mediante síntesis química, y se representan mediante dúplex de oligonucleótidos pequeños. Estos están compuestos por 19 ribonucleótidos con "proyecciones" de 2 desoxirribonucleótidos en el extremo 3'. Tras la síntesis, se sometieron los ARNip a los siguientes procesos de purificación:

- 25
- Eliminación de sales mediante precipitación con etanol, o utilizando columnas de cromatografía de tipo C 18
  - Eliminación de grupo 2'-ACE presente en bases de ARN
  - Apareamiento con la secuencia antisentido (sintetizada en una reacción independiente).
  - Purificación 1: se purifica el dúplex de ARNip mediante electroforesis en gel de acrilamida
  - 30 • Purificación 2: se purifica adicionalmente el dúplex de ARNip, obtenido mediante la etapa descrita anteriormente, con cromatografía de líquidos de intercambio iónico (HPLC)
  - Purificación 3: se somete el dúplex de ARNip, obtenido mediante la etapa descrita anteriormente, a intercambio de contraión (Na<sup>+</sup>), se eliminan las sales, se esteriliza mediante filtración y se somete a prueba para determinar la presencia de endotoxinas.
- 35

### Composiciones y dosificaciones

Los ARNip de la presente invención, sus derivados químicos y/o precursores se pueden administrar de manera sistémica o local.

- 40 Pruebas llevadas a cabo *in vitro* sobre cultivos celulares e *in vivo* en modelo animal demostraron que los ARNip de la presente invención se internalizan eficazmente en la célula sin necesidad de ningún agente de transfección, más bien mediante simple incubación con la célula en solución. De hecho, la incubación, en condiciones de cultivo celular estándar, de osteoclastos diferenciados a partir de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos  
 45 con ARNip de la presente invención o derivados del mismo destacó la incorporación de ARNip en la célula y su conservación hasta +7 días tras el tratamiento (figura 10).

- Por tanto, composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración de los ARNip de la presente invención o de sus derivados químicos son composiciones que contienen una cantidad eficaz farmacéuticamente de ARNip, su derivado o su precursor, en un excipiente adecuado, esencialmente líquido. Tales composiciones están en forma de soluciones, suspensiones o emulsiones. Por tanto, se puede utilizar cualquier excipiente farmacéutico adecuado para tales aplicaciones. Excipientes adecuados son soluciones fisiológicas para utilización parenteral, soluciones hidroalcohólicas, soluciones en glicol, emulsiones de agua/aceite o aceite/agua, emulsiones/suspensiones de liposomas o exosomas, soluciones oleosas, suspensiones micelares, vesículas o complejos con PEI (polietiliminina)  
 55 o complejos con atelocolágeno, conteniendo todos ellos los aditivos, diluyentes, estabilizadores y ajustadores del pH farmacéuticos habituales hasta valores fisiológicos.

- La administración del ARNip de la presente invención, derivados o precursores del mismo, se puede producir por vía parenteral, por ejemplo, la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraósea, intracartilaginosa, intraarticular. Alternativamente, la administración se puede llevar a cabo por vía oral, mediante pastillas, comprimidos, formulaciones para disolución bucal o sublingual, cápsulas, cápsulas blandas, películas, polvos, granulados; por vía rectal o vaginal, mediante supositorios u óvulos; mediante inhalación, por ejemplo intrabronquial.

- 65 Se puede producir administración local mediante cualquier formulación adecuada para aplicación local, por ejemplo mediante aplicación tópica o aplicación directa sobre o en los tejidos que se van a tratar, o de nuevo mediante

administración local de un precursor de ARNip y producción *in situ* del ARNip de la presente invención. Las composiciones basadas en exosomas, liposomas, vesículas, micelas que contienen el ARNip o sus precursores son útiles para alcanzar un efecto tanto sistémico como local.

5 Para obtener un efecto local, los ARNip de la presente invención o sus derivados o precursores se pueden administrar mediante vectores virales o no virales, o mediante el ADN que codifica los ARNip, o como ARN aislado (desnudo) (Pelled *et al.*, 2010 *Tissue Engineering*: parte B, volumen 16, n.º 1, 13-20) o mediante implantes o matrices biocompatibles tridimensionales, basados, por ejemplo, en polímeros de fibrinógeno y trombina y ubicados en el punto de aplicación.

10 En una realización específica, los ARNip o sus derivados o precursores están unidos o asociados o complejados a reactivos habituales que garantizan una distribución *in vivo* eficaz del ARNip, por ejemplo polietilenimina (PEI) o derivados de la misma, tales como el complejo de polietilenimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL), o el complejo de polietilenimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL). En una realización específica de la presente invención, los ARNip están unidos al producto jetPEI®, que es un derivado lineal de polietilenimina proporcionado por PolyPlus Transfection.

15 Alternativamente, los ARNip de la presente invención se pueden administrar de manera local en forma de su precursor de ARNhp dentro del alcance de una terapia génica. Por ejemplo, se puede transferir un ARNhp, o el ADN que codifica un ARNhp, al interior de una célula de mamífero, utilizando, por ejemplo, un plásmido adecuado o un vector adenoviral tal como se describe por Egermann *et al.*, *Human Gene Ther.* mayo de 2006; 17 (5):507-17. Los ARNhp expresados y procesados por la propia célula producen los ARNip correspondientes que pueden silenciar el gen diana.

20 En una forma de administración *in vivo* alternativa a los vectores, los ARNip se pueden transferir al interior de una célula mediante electroporación, poración por ultrasonidos, transfección mediada por liposoma catiónico, microinyección, electropulsación.

25 En otra forma alternativa de administración local, los ARNip de la presente invención, sus derivados o precursores, se pueden unir, adsorber, inmovilizar incluso mediante formación de enlaces covalentes a una matriz que puede liberar el material genético (matriz activada por genes (GAM)) tal como se describe por Luginbuehl *et al.*, 2004, *Eur J Pharm Biopharm* 58:197-208, y después implantarse en la zona de interés tal como se describe por Fang *et al.*, 1996 (*Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5753).

30 Sin embargo, aunque no son necesarios, se pueden utilizar agentes de transfección para mejorar la internalización de ARNip en osteoclastos. Agentes de transfección útiles para la presente invención son: lipofectamina, procedimiento de nucleofección mediante Amaxa Nucleofector® (Lonza Cologne, Alemania) utilizando un kit específico (n.º de cat. VPA-1007, Lonza).

#### 40 **Posología**

Además, pruebas *in vitro* e *in vivo* llevadas a cabo dentro del alcance de la presente invención demostraron que los ARNip internalizados en la célula, es decir en los osteoclastos, conservan su integridad y, por tanto, su funcionalidad a lo largo de un periodo de varios días.

45 Por tanto, el régimen de tratamiento con los ARNip de la presente invención proporciona administraciones desde una vez al día hasta una vez por semana, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 administraciones/semana. Alternativamente, el tratamiento se puede llevar a cabo con una administración diaria, o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7 días.

50 La duración del tratamiento depende de la gravedad de la enfermedad y oscila desde un tratamiento de algunas semanas hasta un tratamiento crónico.

Las pruebas llevadas a cabo por los inventores de la presente invención demostraron que los ARNip de la presente invención son eficaces en la restauración de la funcionalidad de osteoclastos en un amplio espectro de dosificaciones, desde aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto que se va a tratar, o sujeto en el que han aparecido síntomas de progresión de osteopetrosis. En una realización preferente, las dosificaciones serán desde aproximadamente 1 µg/kg hasta 20 mg/kg de peso corporal, preferentemente desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg.

60 Para poder someter a ensayo la eficacia *in vivo* de los ARNip como posibles medicamentos, se adoptó la siguiente metodología:

1. Se verificó que el ARNip para ARNm normal de *clcn7* era eficaz en la reducción de la expresión de gen normal en ratones WT.
2. Se verificó que el ARNip contra ARNm mutado de *clcn7* no alteraba la expresión de gen normal.
3. Se verificó que el ARNip contra ARNm mutado de *clcn7* era eficaz en la reducción del ARNm mutado y en la

mejora del fenotipo de ratones con ADO2. Los procedimientos para tales verificaciones se describen en los ejemplos experimentales.

### Terapia combinada

Los ARNip de la presente invención se pueden utilizar en asociación con otros principios activos. Mediante el término “en asociación” quiere decirse tanto una terapia conjunta o una terapia combinada, como una formulación conjunta en una única forma farmacéutica, o en un único envase comercial, por ejemplo un kit o un blíster de dos o más principios activos.

Los principios activos combinables con los ARNip son, por ejemplo, agentes que pueden aumentar el anabolismo de tejido óseo: por ejemplo teriparatida, blosozumab, romosozumab o incluso factores de crecimiento óseo o ácidos nucleicos que los codifican, por ejemplo, proteínas de la familia de BMP, tales como BMP-2 y/o BMP-7, o ARN, tales como por ejemplo ARN que antagonizan MIR-31, o agentes de transfección tales como, por ejemplo, lipofectamina, procedimiento de nucleofección mediante Amaxa Nucleofector® (Lonza Cologne, Alemania) utilizando un kit específico (n.º de cat. VPA-1007, Lonza).

### Sección experimental

#### Ejemplo 1: generación de vectores que portan las construcciones del gen *CLCN7* conjugado con la secuencia para EGFP (proteína verde fluorescente potenciada).

Para poder realizar los experimentos *in vitro*, se generaron vectores de expresión que portaban la construcción WT del gen *CLCN7*, conjugado con la secuencia de EGFP para permitir la visualización de la proteína de fusión mediante análisis de fluorescencia y cuantificación de la expresión transcripcional del gen mediante RT-PCR en tiempo real para EGFP (WT *CLCN7*/pEGFP-C1) (figura 1). Con este fin, se clonó la secuencia completa de ADNc de *CLCN7* humano ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM\\_001114331.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_001114331.2)) (rzpd IRAUp969B0859D6) en el vector pEGFP-C1 mediante enzimas de restricción HindIII y XhoI. Se amplificó la secuencia humana completa del gen *CLCN7* mediante el kit de ADN polimerasa de alta fidelidad iProof™ (BIO-RAD 172-5301) utilizando cebadores con el extremo 5' dotado de las secuencias de enzimas de restricción HindIII y XhoI. Después, se realizó una digestión doble del vector pEGFP-C1 vacío y del producto de PCR de *CLCN7* durante 3 horas a 37 °C, utilizando las enzimas de restricción HindIII y XhoI. Se purificaron el vector y el producto de PCR digeridos mediante kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen 28104). Después, se realizó la desfosforilación del vector digerido, durante 1 hora a 37 °C, utilizando fosfatasa alcalina de gamba (SAP). Se ligaron 300 ng del producto de PCR de *CLCN7* digerido y 100 ng del vector pEGFP-C1 desfosforilado mediante ADN ligasa de T4, durante la noche a 4 °C. Después se utilizó la ligación para transformar células XIBlue1. Posteriormente, se obtuvieron vectores con construcción mutada p.R767W-, p.G215R-, p.A788D- y p.R286W-*CLCN7*/pEGFP-C1 mediante el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II XL (n.º de cat. á200521, Stratagene), utilizando cebadores que contenían la mutación deseada. Después se comprobó la mutagénesis producida mediante una secuenciación de ADN directa (figura 2).

#### Ejemplo 2: transfecciones

Se utilizaron los vectores para transfectar células HEK293 humanas mediante la técnica de transfección estándar con lipofectamina, después se cuantificó la expresión del ARNm correspondiente mediante RT-PCR en tiempo real. Las transfecciones de la construcción WT y de las construcciones mutadas indujeron niveles similares de expresión transcripcional (figura 3).

Después, la expresión de proteínas WT y mutadas en células HEK293 transfectadas se evaluó mediante microscopía confocal para la detección de proteínas de fusión EGFP. Se demostró la ubicación correcta de la proteína fluorescente mediante ubicación conjunta de marcadores del aparato de Golgi (gamma-adaptina), endosomas tempranos (EEA-1), vesículas de ácidos (*Lysotracker Red*) y lisosomas (lamp-1) (figura 4).

Para demostrar la capacidad de las construcciones mutadas de los inventores que se van a expresar en la línea de osteoclastos e inhibir la resorción ósea, se transfectó la línea murina de precursores de osteoclastos RAW264.7 con vector vacío, o con un vector que portaba las construcciones mutadas. Se comprobaron las expresiones de ARNm y proteína mediante RT-PCR en tiempo real y microscopía confocal, respectivamente, después se sembraron las células en placas sobre secciones de hueso bovino y se diferenciaron para dar osteoclastos maduros mediante tratamiento con RANKL 100 ng/ml durante 4 días. Se cuantificó la resorción ósea mediante el recuento de las lagunas de resorción (fosas) excavadas por osteoclastos (ensayo de índice de fosas). Los resultados demostraron una reducción de la resorción ósea de aproximadamente el 70 % en células RAW264.7 transfectadas con las construcciones mutadas, en comparación con las mismas células transfectadas con el vector vacío (figura 5). Este porcentaje de resorción ósea es muy similar al observado en osteoclastos diferenciados a partir de la sangre periférica de pacientes con ADO2, en comparación con osteoclastos de donantes sanos (6).

Estos experimentos proporcionaron buenas evidencias de que los vectores generados pueden representar herramientas válidas para evaluar la estrategia de los inventores de silenciamiento *in vitro* del gen mutado. Sin

embargo, para verificar que el procedimiento funcionará asimismo en osteoclastos humanos primarios, se estableció un proceso de nucleofección mediante AMAXA Nucleofector. El procedimiento fue satisfactorio, permitiendo una buena hiperexpresión de la proteína de fusión EGFP del inventor en osteoclastos diferenciados a partir de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos (figura 6).

La evaluación de la resorción ósea en osteoclastos humanos transfectados con las construcciones humanas demostró una vez más una reducción del 70 % en comparación con células transfectadas con el vector vacío (no mostrado).

### 10 Ejemplo 3: tratamientos *in vitro* con ARNip

Tras haber establecido los procedimientos de investigación, se diseñaron ARNip contra las mutaciones mencionadas anteriormente del gen *CLCN7* (tabla 2) y se asignaron para su síntesis a Dharmacon Company. Además, se adquirió la combinación comercial de ARNip contra gen *CLCN7* WT y ARNip de control reorganizado al azar (secuencia de nucleótidos mixta).

Se realizó el establecimiento del procedimiento con ARNip contra la mutación p.R767W. Después se extendió a las otras mutaciones. Se evaluó un ARNip específico para el transcrito que portaba la mutación p.R767W (ARNip de R286W 1) para determinar la eficacia y especificidad en células HEK293 transfectadas con vectores WT- o p.R767W-*CLCN7*/EGFP. Los resultados mostraron una reducción de  $\leq 60$  % de la expresión de ARNm mutado. Sin embargo, este resultado positivo se vio invalidado por una reducción similar de ARNm normal en células transfectadas con el vector WT *CLCN7*/EGFP (figura 7).

Aunque este ARNip no mostró especificidad por el gen mutado, su buena eficacia en la reducción del ARNm del transcrito mutado era alentadora. Por tanto, se evaluó su efecto sobre la resorción ósea utilizando células RAW264.7 transfectadas con la construcción R767W- o WT-*CLCN7*/EGFP. En estas condiciones experimentales, se demostró que el ARNip para el ARNm mutado mostró una capacidad parcial para reactivar la resorción ósea en comparación con el ARNip reorganizado al azar de control. En este experimento, se observó una inhibición moderada de la resorción ósea en células transfectadas con vector WT-*CLCN7*/EGFP y sometidas a tratamiento con ARNip contra la mutación p.R767W (figura 8). Esta reducción, menor que la observada en células transfectadas con vector mutado (comparar las barras segunda y tercera desde la izquierda) se puede deber a la abundancia de expresión de ARNm de *CLCN7* en células RAW264.7, debido a la presencia tanto de ARNm endógeno como de ARNm producido por la construcción transfectada.

En este punto, se adoptó una estrategia para aumentar la especificidad hacia el ARNm mutado. Esto se obtuvo insertando un nucleótido no complementario (correspondencia errónea) en diversas posiciones en el sentido de 3' del nucleótido mutado (11). Con esta estrategia, se diseñaron tres ARNip novedosos para la mutación p.R767W (tabla 2). Los tres ARNip mostraron una mayor especificidad por el ARNm mutado en comparación con el ARNm WT. Con uno de ellos (denominado ARNip de p.R767W 2C), se obtuvo una eficacia del 90 % de reducción de ARNm mutado, sin ninguna reducción de ARNm WT (figura 9).

Después, se trataron osteoclastos humanos con ARNip para el gen *CLCN7* normal utilizando ARNip conjugados con fluoróforo Cy3 (Cy3-ARNip WT). El objetivo era establecer la estrategia de internalización de ARNip en células primarias, utilizando microscopía confocal para su comprobación. En estas condiciones, se observó que los osteoclastos internalizan los ARNip sin necesidad de ningún agente de transfección. De hecho, la incubación, en condiciones de cultivo estándar, de osteoclastos diferenciados a partir de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos con Cy3-ARNip WT 300 nM destacó la incorporación de ARNip en la célula y su conservación hasta +7 días desde el tratamiento (figura 10A).

Para demostrar la capacidad de ARNip de R767W C para reducir la expresión de p.R767W mutado de *CLCN7* y reducir su efecto perjudicial sobre la resorción ósea, se transfectaron osteoclastos humanos con el vector p.R767W *CLCN7*/pEGFP y se trataron con ARNip de p.R767W 2C 500 nM. En estas circunstancias, se destacó una expresión transcripcional reducida de la secuencia de proteína fluorescente EGFP (figura 10B) y la restauración de la capacidad de los osteoclastos por resorber hueso (figura 10C) en células tratadas con ARNip de p.R767W 2C, en comparación con osteoclastos tratados con ARNip reorganizado al azar.

Después, se evaluó si el tratamiento con ARNip de p.R767W 2C influía sobre la expresión transcripcional del transcrito de *CLCN7* normal y la capacidad para resorber hueso en osteoclastos humanos a partir de un donante sano. Los resultados mostraron una buena eficacia del ARNip dirigido contra *CLCN7* normal (utilizado como control positivo) en la reducción de este ARNm, mientras que no se observó ningún efecto sobre el mismo mediante ARNip de p.R767W 2C (figura 11). Según este resultado, el ARNip de p.R767W 2C no modificó la resorción ósea de osteoclastos a partir de donantes sanos (figura 12).

En conjunto, estos resultados muestran que la estrategia de los inventores fue satisfactoria y les permitió diseñar ARNip altamente específicos contra la mutación p.R767W del gen *CLCN7*, que no tenían ningún efecto sobre el ARNm normal de osteoclastos humanos. Siguiendo la misma estrategia, se diseñaron ARNip contra las otras tres

mutaciones descritas anteriormente, p.G215R, p.A788D y p.R286W (tabla 2). A partir de un análisis más detallado de los resultados, se desprendió que, para la mutación p.A788D, aún no se han identificado ARNip que cumplan los criterios de eficacia y especificidad requeridos para su utilización en la terapia de ADO2 dependiente de *CLCN7*. En cuanto a las mutaciones p.R286W y p.G215R, se identificaron en vez de eso ARNip para los que se cumplían los

5 criterios de eficacia y especificidad (tabla 2). Dado que, para la mutación de ARNip de p.G215R, se dispone actualmente de un modelo murino de enfermedad, se estudiaron las características del ARNip eficaz identificado en la tabla 2 con la abreviatura p.G215R 2M. Demostró ser altamente activo en la reducción de la expresión de ARNm mutado en células HEK293 y en osteoclastos humanos primarios (figura 13, figura 28).

10 Además, utilizando osteoclastos murinos a partir del modelo animal de ADO2 generado en el laboratorio de los inventores (10), que portaba el homólogo murino (p.G213R) de la mutación humana (p.G215R), se demostró que el tratamiento con ARNip de p.G213R (tabla 3) podía aumentar la resorción ósea (figura 14).

**Ejemplo 4: tratamientos *in vivo***

15 Para poder someter a ensayo la eficacia de ARNip *in vivo*, como medicamentos, se siguió el siguiente procedimiento:

- 20 i) Verificar que el ARNip para ARNm normal de *clcn7* es eficaz en la reducción de la expresión de gen normal en ratones WT.
- ii) Verificar que el ARNip contra ARNm mutado de *clcn7* no altera la expresión de gen normal.
- iii) Verificar que el ARNip contra ARNm mutado de *clcn7* es eficaz en la reducción del ARNm mutado y en la mejora del fenotipo de ratones con ADO2.

**i) Verificar que el ARNip para ARNm normal de *clcn7* es eficaz en la reducción de la expresión de gen normal en ratones WT.**

25 Este grupo de experimentos se llevó a cabo con una combinación de ARNip contra el gen *clcn7* normal, disponible en el mercado a partir de Dharmacon, cuya secuencia de nucleótidos se desconoce. Se trataron ratones CD1 de 1 mes de edad (n=4) con 2 mg/kg de ARNip de *clcn7* inoculado mediante kit de administración hidrodinámica *TransIT-QR* (Quick Recovery). La solución de *TransIT* se estudia específicamente para la administración segura y eficaz de ácidos nucleicos, utilizando el procedimiento de inyección hidrodinámica en la vena de la cola. Tras 24-48 horas, se sacrificaron los animales y se sometieron a disección anatómica para extirpar el corazón, el bazo, el hígado, los riñones, el cerebro, los pulmones y las tibias (figura 15). Este último resultado depende probablemente de la incapacidad de ARNip de *clcn7* para cruzar la barrera hematoencefálica.

30 Después, se determinó asimismo en ratones CD1 normales cuál era la mejor ruta de administración de ARNip de *clcn7*, con el fin de verificar la viabilidad de tratamientos repetidos. La inyección mediante el kit de administración hidrodinámica *TransIT-QR* demostró ser eficaz, pero sólo se puede realizar una vez y en ratones adultos. La administración intraperitoneal demostró ser fácil de realizar desde los primeros días de vida de los animales. La infusión venosa fue asimismo eficaz, pero fue posible realizarla únicamente en ratones adultos y un número muy limitado de veces. Por tanto, se eligió la inyección intraperitoneal para estudios posteriores. Además, se realizaron pruebas y se determinó que la mejor frecuencia de administración era de 48 horas, momento en el que se demostró la mejor respuesta dependiente de la dosis tanto en el hueso como en otros órganos. La dosis máxima utilizada en esta serie de experimentos (0,5 mg/kg de peso corporal), administrada 3 veces por semana durante 3 semanas, no indujo modificaciones de parámetros óseos estructurales, medidos mediante microtomografía computerizada ( $\mu$ TC). Los inventores explican este resultado negativo con la noción de que el gen es haplosuficiente y que este régimen de tratamiento ha reducido el ARNm de *clcn7* en tan sólo el 60 %, dejando un 40 % de ARNm suficiente probablemente para llevar a cabo sus funciones. En cualquier caso, el tratamiento no indujo ningún signo de sufrimiento, ni provocó ninguna angustia evidente en los animales.

**ii) Verificar que el ARNip contra ARNm mutado de *clcn7* no altera la expresión de gen normal y no induce efectos adversos.**

35 Para demostrar este aspecto, se trataron ratones CD1 normales con ARNip de p.G213R-*clcn7* (tabla 3) (0,5 mg/kg) y se observó que no existía ninguna reducción del transcrito normal, a diferencia de lo que se descubrió en el tratamiento con el ARNip de *clcn7* dirigido contra el transcrito normal. En todos estos experimentos, el ARNip reorganizado al azar de control nunca provocó alteraciones de la expresión del gen *clcn7*, ni normal, ni mutado. Con estos experimentos, los inventores demostraron, por tanto, que los ARNip para una de las mutaciones del gen *clcn7* son ineficaces frente al transcrito normal y no inducen efectos secundarios adversos.

**iii) Verificar que el ARNip contra ARNm mutado de *clcn7* es eficaz en la reducción del ARNm mutado y en la mejora del fenotipo de ratones con ADO2**

60 Por tanto, para someter a prueba la eficacia de su tratamiento, se llevó a cabo un experimento en el único modelo de ADO2 murino disponible (12). Este modelo se creó en la raza de ratones C57BL/6 mediante tecnología de inserción,

que permitió la sustitución del exón 7 normal del gen *clcn7* por un exón 7 mutado mediante una transición G-A en la posición 14365 del ADN, correspondiente a la mutación de proteína p.G213R.

5 Los ratones homocigóticos para esta mutación son pequeños, carecen de dentición y mueren dentro del plazo de 30 días desde el nacimiento, aunque se les alimenta con dieta blanda. Muestran un fenotipo osteopetrótico extremadamente grave, médula ósea fibrosa y degeneración de la corteza cerebelar y del hipocampo similar a lo que se descubrió en un modelo murino con desactivación de *clcn7* y en osteopetrosis autosómica recesiva humana.

10 Los ratones heterocigóticos nacen a la frecuencia mendeliana normal, son vitales y fértiles y no se ven afectados por alteraciones de tamaño, peso corporal y dentición. En vez de eso, muestran los signos típicos de una osteopetrosis menos grave, sin signos evidentes de neurodegeneración. Los ratones heterocigóticos adultos (3 meses de edad) muestran una mayor densidad mineral y mayor masa ósea, verificadas mediante análisis por  $\mu$ TC de parámetro óseo estructural trabecular de las tibias, los fémures y las vértebras. Este aumento de masa ósea es persistente, se puede encontrar asimismo en ratones mayores, y es similar en machos y hembras. El examen histológico de ratones heterocigóticos de 3 meses de edad mostró un aumento de la expresión de la enzima específica de osteoclastos, TRAcP, y un aumento del número/superficie de osteoclastos / superficie de hueso. A pesar de este aumento, la resorción ósea está reducida tal como se indica mediante niveles en suero de marcador de resorción ósea, CTX, normalizados para la actividad en suero de la enzima osteoclástica TRAcP. Por el contrario, todos los parámetros de formación ósea [marcador en suero (osteocalcina), superficie de osteoblastos/superficie de hueso, tasa de formación ósea, grosor de osteoide, grosor de placa de crecimiento] demuestran que no existe ninguna implicación de osteoblastos o condrocitos, ni los ratones tienen un fenotipo compatible con osteopetrorraquitismo.

25 La médula ósea extraída de ratones muestra un aumento del número de precursores de osteoclastos y una mayor osteoclastogénesis *in vitro* en presencia de M-CSF y RANKL. No obstante, la resorción ósea se reduce en comparación con osteoclastos obtenidos a partir de la médula ósea de ratones normales. Los ratones heterocigóticos tienen parámetros hematológicos y en suero normales (amilasa pancreática, transaminasas hepáticas, potasio, calcio, fósforo, concentración de glucosa y creatinina cinasa en músculo), mientras que los niveles de hormona paratiroidea están aumentados, según la osteoclastogénesis aumentada.

30 Habiendo obtenido un modelo de ADO2 murino fiable, se verificó en el mismo si la terapia con ARNip dirigidos contra la mutación p.G215R era eficaz. En primer lugar, se establecieron la dosis óptima y el tiempo de administración de ARNip de p.G213R-*clcn7*. Para ello, se diseñaron en primer lugar cebadores que podían amplificar exclusivamente el transcrito mutado (figuras 16 y 17). Después, se trataron ratones con ADO2 p.G213R-*clcn7* con 2 o 4 mg/kg de peso corporal de ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI mediante inyección intraperitoneal, verificando la cinética en suero del ARN total (figura 18) y confirmando la reducción de la expresión de ARNm mutado de p.G213R-*clcn7* mediante RT-PCR en tiempo real en ratones tratados con ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI en comparación con ratones tratados con ARNip de control (reorganizado al azar) (figura 19). Esta reducción se confirmó asimismo en la tibia (figura 20) y ya no era evidente tras 96 horas desde la administración de ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI, una circunstancia que indica que la mejor frecuencia de tratamiento es de 48 horas.

45 Para verificar si este tratamiento podía tener un efecto sobre la resorción ósea *in vivo*, se trataron ratones con ADO2 p.G213R-*clcn7* de 10 días de edad, 3 veces por semana durante 2 semanas y 4 semanas, con 4 mg/kg de peso corporal de ARNip cohesivo de control (reorganizado al azar)/jetPEI, o ARNip específico de p.G213R-*clcn7*. El tratamiento se toleró bien y no indujo daños histopatológicos en órganos vitales (figura 21). Además, mejoró biomarcadores de daño renal, hepático y muscular (figura 22). Se analizó el efecto terapéutico del tratamiento sobre el biomarcador de resorción ósea CTX, normalizado para el biomarcador osteoclástico TRAcP. Los resultados demostraron un aumento significativo de los niveles en suero de CTX y de la proporción de CTX/TRAcP en ratones tratados con ARNip cohesivo de p.G213R-*clcn7*/jetPEI, como evidencia de que se produjo activación de resorción ósea osteoclástica (figura 23). De manera compatible, el análisis por  $\mu$ TC del extremo proximal de la tibia ya mostró una reducción del porcentaje de volumen de hueso trabecular/volumen de tejido total y una mejora de variables trabeculares estructurales tras 2 semanas de tratamiento (figura 24). Tras 4 semanas, se observó una restauración total de parámetros estructurales (figura 25) y funcionalidad de osteoclastos (figura 26), sin ningún efecto no deseado sobre parámetros osteoblásticos (figura 27). Finalmente, se observó asimismo una mejora de parámetros biomecánicos (figura 28), indicativo de la restauración de una buena calidad de tejido óseo. Estos resultados indican que el aumento de la resorción ósea inducido mediante el tratamiento de los inventores era eficaz en la corrección del fenotipo óseo de ratones con ADO2.

60 Para completar el estudio terapéutico, se confirmaron adicionalmente la capacidad de los ARNip identificados en la reducción de la expresión de *CLCN7* mutado humano en osteoclastos a partir de donantes sanos transfectados con las construcciones que portaban las mutaciones p.G215R, p.R286W y p.R767W, así como la capacidad del ARNip específico de p.G215R para mejorar la resorción ósea en osteoclastos obtenidos a partir de un paciente (figura 29).

65 En cuanto a los ARNip para la mutación p.R767W y para cualquier otra mutación que se va a analizar *in vivo*, en la actualidad no se puede sugerir que se puedan generar modelos murinos para cada mutación, teniendo en cuenta tanto los tiempos como los costes de implementación. Por tanto, para someter a prueba la eficacia *in vivo* de ARNip



de p.R767W 2C, que los inventores habían descubierto que es activo *in vitro*, se adoptó una estrategia alternativa. Se transfectaron de manera estable células MDA-MB-231 de cáncer de mama humanas con vector p.R767W-CLCN7/EGFP-C1 y se trataron *in vitro* con ARNip de R767W 2C para verificar su eficacia y especificidad sobre el silenciamiento de ARNm mutado de *CLCN7* (figura 30A). Después, se inyectaron las células transfectadas con el vector p.R767W-CLCN7/EGFP-C1 en el tejido subcutáneo de ratones Balb/c *nu/nu* atímicos (inmunocomprometidos), en los que formaron tumores evidentes de manera macroscópica. Cuando los tumores alcanzaron el volumen de 1 cm<sup>3</sup>, se trataron los ratones con una única inyección intraperitoneal de 4 mg/kg de peso corporal de ARNip de R767W 2C/jetPEI. Tras 48 horas se sacrificaron los ratones, se escindieron los tumores y se analizaron, mediante RT-PCR en tiempo real, para determinar la expresión del transcrito de EGFP conjugado con el gen mutado. En estas condiciones experimentales, se obtuvo una reducción transcripcional de p.R767W-CLCN7/EGFP expresado en el tumor de aproximadamente el 50 %. Para comprobar la especificidad del ARNip elaborado por los inventores, se llevó a cabo asimismo el mismo protocolo de tratamiento utilizando ARNip para el gen *CLCN7* WT, no hallando ningún cambio en la expresión transcripcional de la EGFP conjugada con la construcción mutada (figura 30).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Deng Y, Wang CC, Choy KW, Du Q, Chen J, Wang Q, Chung TK, Tang T. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. *Gene*. 538:217-227, 2014.
2. J. Bollerslev. Osteopetrosis, A genetic and epidemiological study, *Clin. Genet*. 31:86-90, 1987.
3. O.D. Bénichou, J.D. Laredo, M.C. de Vernejoul, Type II autosomal dominant osteopetrosis (Albers-Schönberg disease): clinical and radiological manifestations in 42 patients. *Bone* 26 (2000) 87-93.
4. A. Frattini, A. Pangrazio, L. Susani, C. Sobacchi, M. Mirolo, M. Abinun, M. Andolina, A. Flanagan, E.M. Horwitz, E. Mihci, L.D. Notarangelo, U. Ramenghi, A. Teti, J. Van Hove, D. Vujic, T. Young, A. Albertini, P.J. Orchard, P. Vezzoni, A. Villa, Chloride channel *CICN7* mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J. Bone Miner. Res.* 18:1740-1747, 2003.
5. B. Peruzzi, A. Teti. The physiology and pathophysiology of the osteoclast. *Clin Rew Bone Miner Metab*. 10:71-97, 2012.
6. A. Del Fattore, B. Peruzzi, N. Rucci, I. Recchia, A. Cappariello, M. Longo, D. Fortunati, P. Ballanti, M. Iacobini, M. Luciani, R. Devito, R. Pinto, M. Caniglia, E. Lanino, C. Messina, S. Cesaro, C. Letizia, G. Bianchini, H. Fryssira, P. Grabowski, N. Shaw, N. Bishop, D. Hughes, R.P. Kapur, H.K. Datta, A. Taranta, R. Fornari, S. Migliaccio, A. Teti. Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment, *J. Med. Genet*. 43:315-325, 2006.
7. K. Chu, D.L. Koller, R. Snyder, T. Fishburn, D. Lai, S.G. Waguespack, T. Foroud, M.J. Econs. Analysis of variation in expression of autosomal dominant osteopetrosis type 2: searching for modifier genes, *Bone* 37:655-661, 2005.
8. E. Cleiren, O. Bénichou, E. Van Hul, J. Gram, J. Bollerslev, F.R. Singer, K. Beaverson, A. Aledo, M.P. Whyte, T. Yoneyama, M.C. deVernejoul, W. Van Hul, Albers-Schönberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the *CICN7* chloride channel gene, *Hum. Mol. Genet*. 10:2861-2867, 2001.
9. U. Kornak, D. Kasper, M.R. Bösl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Delling, T.J. Jentsch, Loss of the *CIC-7* chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*: 104:205-215, 2001.
10. A. Del Fattore, M. Capannolo, N. Rucci, A. Teti. New experimental therapeutic approach by siRNA for autosomal dominant osteopetrosis (ADO). *Bone* 46:142, 2010 (resumen).
11. Y. Ohnishi, Y. Tamura, M. Yoshida, K. Tokunaga, H. Hohjoh H. Enhancement of allele discrimination by introduction of nucleotide mismatches into siRNA in allele-specific gene silencing by RNAi. *PLoS ONE*. 3:e2248, 2008.
12. I. Alam, A.K. Gray, K. Chu, S. Ichikawa, K.S. Mohammad, M. Capannolo, M. Capulli, A. Maurizi, M. Muraca, A. Teti, M.J. Econs, A. Del Fattore. Generation of the first autosomal dominant osteopetrosis type II (ADO2) disease models. *Bone*. 59:66-75, 2014.

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Università degli Studi dell'Aquila - Italia

<120> siRNA OSTEOPETROSI BI4714R

<130> BI4714R

<160> 33

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

	<220> <223> ARNip	
5	<400> 1 uuccucaaua gggugaaga	19
	<210> 2 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10		
	<220> <223> ARNip	
15	<400> 2 uuccucaaua ggguggaga	19
	<210> 3 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20		
	<220> <223> ARNip	
25	<400> 3 uuccucaaua ggguaaga	19
	<210> 4 <211> 18 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30		
	<220> <223> ARNip	
35	<400> 4 uuccucaaua ggugaagg	18
	<210> 5 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40		
	<220> <223> ARNip	
45	<400> 5 uuccucaaua gugugaaga	19
	<210> 6 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50		
	<220> <223> ARNip	
55	<400> 6 uuccucaaua gggugacga	19
	<210> 7 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60		
	<220> <223> ARNip	
65	<400> 6 uuccucaaua gggugacga	19
	<210> 7 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
70		

<220>  
 <223> ARNip  
 5 <400> 7  
 uuccucaaca gggugaaua 19  
 <210> 8  
 <211> 19  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 15 <400> 8  
 caacagagug aagaucucc 19  
 <210> 9  
 <211> 19  
 20 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> ARNip  
 <400> 9  
 uuccucaaca gggugaaga 19  
 30 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> ARNip  
 <400> 10  
 40 cucaacaggg ugaagaucc 19  
 <210> 11  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> ARNip  
 <400> 11  
 50 caacagggug aagaucucc 19  
 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 60 <400> 12  
 aacagguuga agaucucc 19  
 <210> 13  
 <211> 19  
 65 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 753 355 T3

<220>  
 <223> ARNip  
 5 <400> 13  
 aacaggguga agauccccc 19  
 <210> 14  
 <211> 19  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 15 <400> 14  
 ccugggccug uggcaccug 19  
 <210> 15  
 <211> 19  
 20 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 25 <400> 15  
 ccugggccug uggcacuu 19  
 <210> 16  
 <211> 19  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 35 <400> 16  
 ccugggccug uggcgccug 19  
 <210> 17  
 <211> 19  
 40 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> ARNip  
 <400> 17  
 50 ccugggccug uggcaucug 19  
 <210> 18  
 <211> 19  
 55 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 60 <400> 18  
 acagagaagu gggacuucg 19  
 <210> 19  
 <211> 19  
 65 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ARNip  
 5 <400> 19  
 acagagaagu gggacuucu 19  
 <210> 20  
 <211> 19  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 15 <400> 20  
 acagagaagu ggggcuucg 19  
 <210> 21  
 <211> 19  
 20 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 25 <400> 21  
 acagagaagu gggauuucg 19  
 <210> 22  
 <211> 19  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 35 <400> 22  
 aggaccucga cagguaccg 19  
 <210> 23  
 <211> 19  
 40 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> ARNip  
 <400> 23  
 50 aggaccucga cagguaccu 19  
 <210> 24  
 <211> 19  
 55 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNip  
 60 <400> 24  
 aggaccucga caguuaccg 19  
 <210> 25  
 <211> 19  
 65 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

	<220> <223> ARNip	
5	<400> 25 aggaccucga caggcaccg	19
	<210> 26 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10		
	<220> <223> ARNip	
15	<400> 26 aggaccucga cugguaccg	19
	<210> 27 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20		
	<220> <223> ARNip	
25	<400> 27 aggaccucga cagguaacg	19
	<210> 28 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30		
	<220> <223> ARNip	
35	<400> 28 aggaccucga caggucccg	19
40	<210> 29 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45		
	<220> <223> ARNip	
50	<400> 29 ggaacucgac agguaccgc	19
	<210> 30 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55		
	<220> <223> ARNip	
60	<400> 30 aacaggguga agauctccc	19
	<210> 31 <211> 19 <212> ARN <213> Mus <ratón, género>	
65		

# ES 2 753 355 T3

<220>  
<223> ARNip WT *cln7*

5 <400> 31  
aaugggguga agauccccc 19

<210> 32  
<211> 17  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador directo

15 <400> 32  
caagtgcttc ctcaatg 17

<210> 33  
<211> 18  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador inverso

25 <400> 33  
gccctcttc aagctaaa 18

## REIVINDICACIONES

1. ARN de interferencia pequeño (ARNip) complementario a la región que comprende una mutación puntual en el ARN mensajero (ARNm) del gen humano mutado *CLCN7*, o derivado o precursor del mismo, **caracterizado por que**:
- la mutación se selecciona de una de las mutaciones que dan como resultado las siguientes mutaciones de la proteína correspondiente CIC-7: p.Y99C, p.D145G, p.W179X, p.G203D, p.L213F, p.G215R, p.P249L, p.R286W, p.R286Q, p.P470Q, p.R409W, p.L490F, p.G677V, p.688del, p.K689E, p.R762L, p.G765B, p.L766P, p.R767W, p.A788D, R223L, R223P, R223G, R223K, R223W, R223I, R223M, R223C, R223S, R265L, R265P, R265G, R265K, R265W, R265I, R265M, R265C, R265S, R271L, R271P, R271G, R271K, R271W, R271I, R271M, R271C, R271S, R280L, R280P, R280G, R280K, R280W, R280I, R280M, R280C, R280S, R281L, R281P, R281G, R281K, R281W, R281I, R281M, R281C, R281S, R286L, R286P, R286G, R286K, R286I, R286M, R286C, R286S, R326L, R326P, R326G, R326K, R326W, R326I, R326M, R326C, R326S, R362L, R362P, R362G, R362K, R362W, R362I, R362M, R362C, R361S, R403L, R403P, R403G, R403K, R403W, R403I, R403M, R403C, R403S, R405L, R405P, R405G, R405K, R405W, R405I, R405M, R405C, R405S, R409L, R409P, R409G, R409K, R409W, R409I, R409M, R409C, R409S, R436L, R436P, R436G, R436K, R436W, R436I, R436M, R436C, R436S, R526L, R526P, R526G, R526K, R526W, R526I, R526M, R526C, R526S, C211F, C211S, C211Y, C211R, C211G, C211W, C411F, C411S, C411Y, C411R, C411G, C411W, C438F, C438S, C438Y, C438R, C438G, C438W, W541R, W541S, W541L, W541G, W616R, W616S, W616L, W616G, L224S, L224P, L224W, L224H, L224Q, L224R, L224F, L224I, L224M, L224V, L224S, L224P, L224W, L224H, L224Q, L224R, L224F, L224I, L224M, L224V, L227Q, L227R, L227F, L227I, L227M, L227V, L564S, L564P, L564W, L564H, L564Q, L564R, L564F, L564I, L564M, L564V, S290Y, S290C, S290W, S290F, S290P, S290L, S290T, S290A, S290N, S365Y, S365C, S365W, S365F, S365P, S365L, S365T, S365A, S365N, S473Y, S473C, S473W, S473F, S473P, S473L, S473T, S473A, S473N, G241R, G241S, G241W, G241C, G241D, G241E, G241A, G241V, G347R, G347S, G347W, G347C, G347D, G347E, G347A, G347V, G361R, G361S, G361W, G361C, G361D, G361E, G361A, G361V;
  - que el ARNip tiene una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de 15 a 25 nucleótidos, que contiene la mutación puntual;
  - que el ARNip reduce la expresión de la proteína mutada CIC-7;
  - y que la proporción de eficacia del ARNip en la reducción de la expresión de proteína mutada CIC-7 en comparación con la proteína normal es mayor que uno
  - y en el que dicho derivado está **caracterizado por que** comprende una o varias bases modificadas químicamente que aumentan la estabilidad y/o mejoran la eficiencia y dicho precursor es un ARNhp.
2. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, según la reivindicación 1, en el que la mutación se selecciona de una de las mutaciones que dan como resultado las siguientes mutaciones de la proteína correspondiente CIC-7: L213F, G215R, R286W, R286Q, R286L, R286P, R286G, R286K, R286I, R286M, R286C, R286S, p.R767W, A788D.
3. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** la secuencia del ARNip comprende, además del nucleótido mutado, una o varias correspondencias erróneas de nucleótidos en comparación con la secuencia diana correspondiente del ARNm que contiene la mutación.
4. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la secuencia del ARNip comprende una secuencia corta de dTdT o dAdT que sobresale en el extremo 3'.
5. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el derivado es un ARNip que comprende uno o varios nucleótidos modificados químicamente, preferentemente seleccionados del grupo que comprende: derivados de 2'-alcoxilo, derivados de 2'-metoxilo, derivados de 2'-etoxilo, derivados de 2'-flúor, derivados de 2'-O-(2-metoxietilo), derivados de 2'-O-bencilo, derivados de 2'-O-metil-4-piridinilo, derivados de 2'-amino, derivados de 2'-aminoetilo, derivados de 2'-guanidinopropilo o derivados de ANB.
6. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ARNip o derivado o precursor del mismo está unido o asociado o complejo a polietilénimina (PEI) o a un derivado de la misma seleccionado del complejo de polietilénimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL), o el complejo de polietilénimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL).
7. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado por que** el precursor es un ARNhp.
8. ARN de interferencia pequeño (ARNip), según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, seleccionado de las secuencias:



CAACAGGGUGAAGAUC~~CCC~~ (SEQ ID NO: 11)  
 AACAGGGUGAAGAUC~~CCC~~ (SEQ ID NO: 13)  
 CCUGGGCCUGUGGCACCU~~G~~ (SEQ ID NO: 14)  
 5 CCUGGGCCUGUGGCACCU~~U~~ (SEQ ID NO: 15)  
 CCUGGGCCUGUGGC~~CC~~UG (SEQ ID NO: 16)  
 CCUGGGCCUGUGGCAUC~~UG~~ (SEQ ID NO: 17)  
 ACAGAGAAGUGGGACUUC~~U~~ (SEQ ID NO: 19)  
 ACAGAGAAGUGGGGCUUC~~G~~ (SEQ ID NO: 20)  
 10 ACAGAGAAGUGGGAUUC~~G~~ (SEQ ID NO: 21)  
 GGAACUCGACAGGUACCG~~C~~ (SEQ ID NO: 29)

teniendo todas las secuencias opcionalmente una secuencia de dTdT o dAdT corta que sobresale en el extremo 3' o derivados o precursores de las mismas.

15 9. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización en un tratamiento terapéutico.

20 10. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su utilización en el tratamiento terapéutico de ADO2 provocada por una mutación del gen *CLCN7* o en el tratamiento terapéutico de la osteopetrosis.

25 11. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que dicho tratamiento terapéutico proporciona una administración diaria, o una administración cada 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, preferentemente con dosificaciones para administración individual desde aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, o desde aproximadamente 1 µg/kg hasta 20 mg/kg de peso corporal, o desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg.

30 12. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el tratamiento terapéutico contempla la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraósea, intracartilaginosa, intraarticular, oral, oral con disolución bucal, oral con disolución sublingual, rectal, vaginal, intrabronquial, por inhalación, o para su administración mediante electroporación, poración inducida por ultrasonidos, transfección mediada por liposoma catiónico, microinyección, electropulsación o mediante vectores virales o no virales, o mediante el ADN que codifica el ARNip o como ARN aislado (desnudo) o mediante implantes o matrices biocompatibles tridimensionales.

35 13. ARN de interferencia pequeño (ARNip), derivado o precursor del mismo, para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el tratamiento terapéutico contempla la administración de ARNip, derivado o precursor del mismo, asociado con uno o varios principios activos adicionales.

40 14. Procedimiento para la preparación del ARNip, o derivados o precursores del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** los ARNip se han preparado mediante síntesis química y purificación posterior.

45 15. Composición farmacéutica que comprende, como principio activo, uno o varios ARN de interferencia pequeños (ARNip), derivado o precursor de los mismos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, opcionalmente en combinación con un principio activo adicional y un excipiente farmacológicamente aceptable, preferentemente dicha composición farmacéutica comprende exosomas, liposomas, vesículas, micelas.

50 16. Composición farmacéutica, según la reivindicación 15, para su utilización en el tratamiento terapéutico de ADO2 provocada por una mutación del gen *CLCN7*.

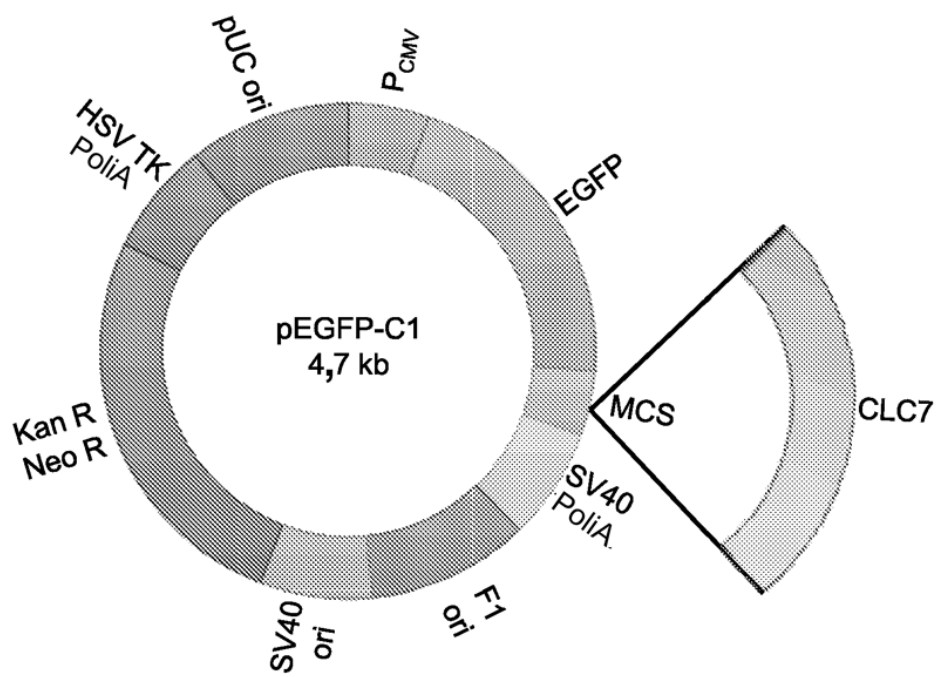


Figura 1

MUTACIÓN
p.G215R
677-AACGGGG-684 A
p.R286W
890-AAGCGGG-896 T
p.R767W
2281-GCCCCAG-2287 A
p.A788D
2397-TCGCCAG-2403 A

Figura 2

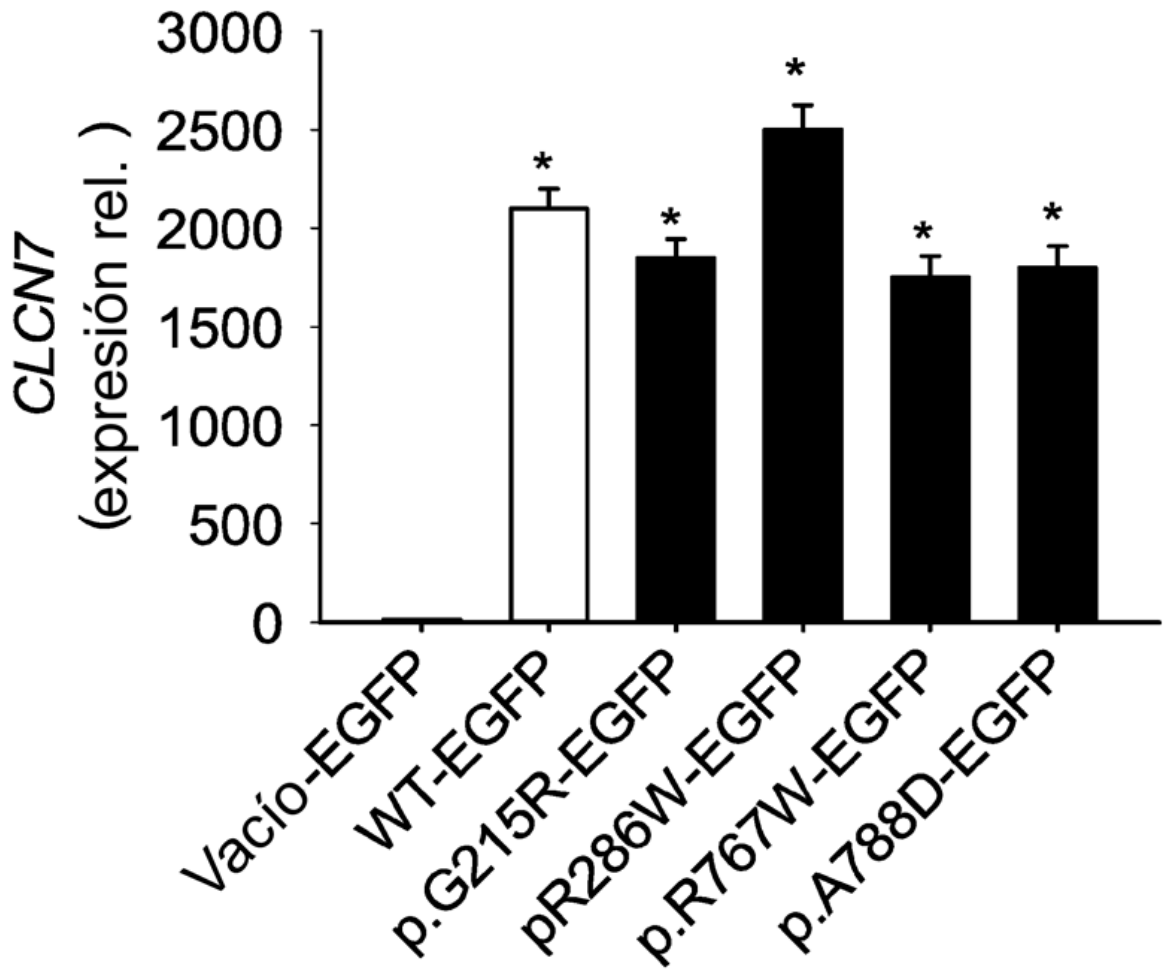


Figura 3

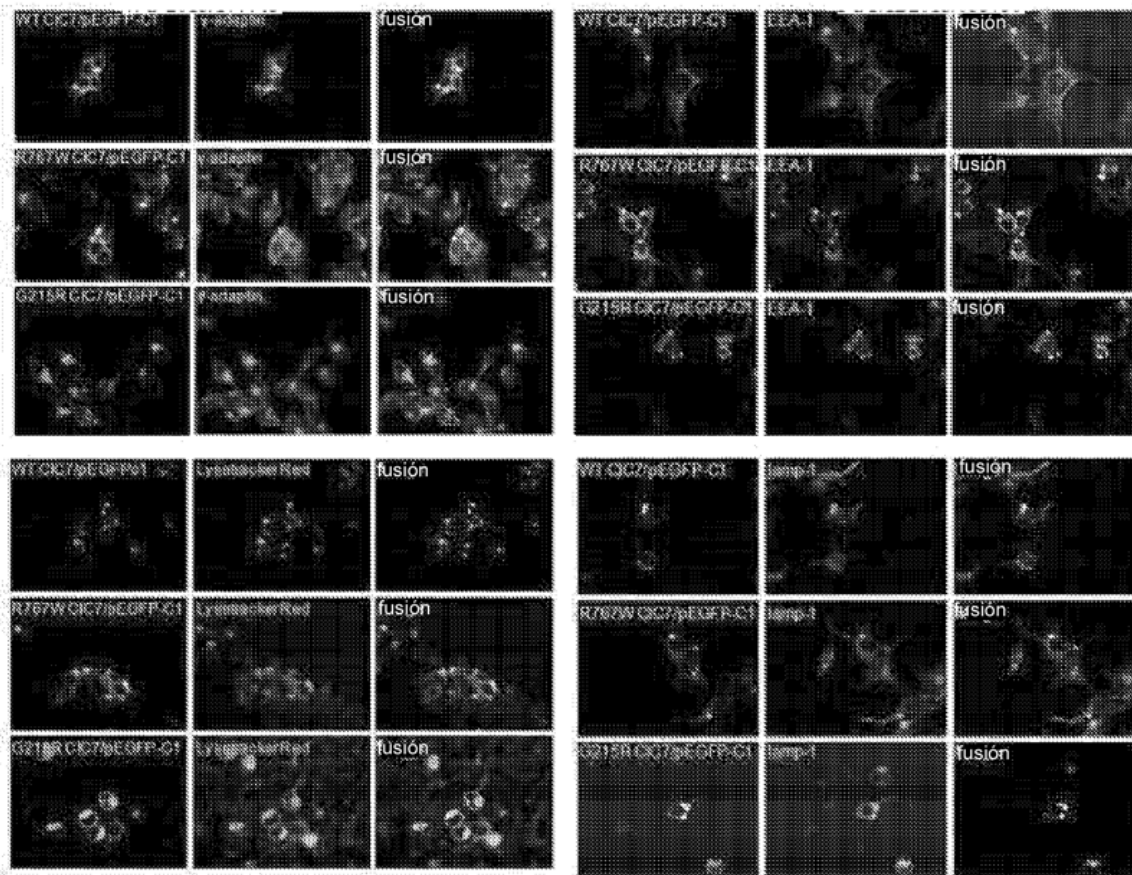


Figura 4

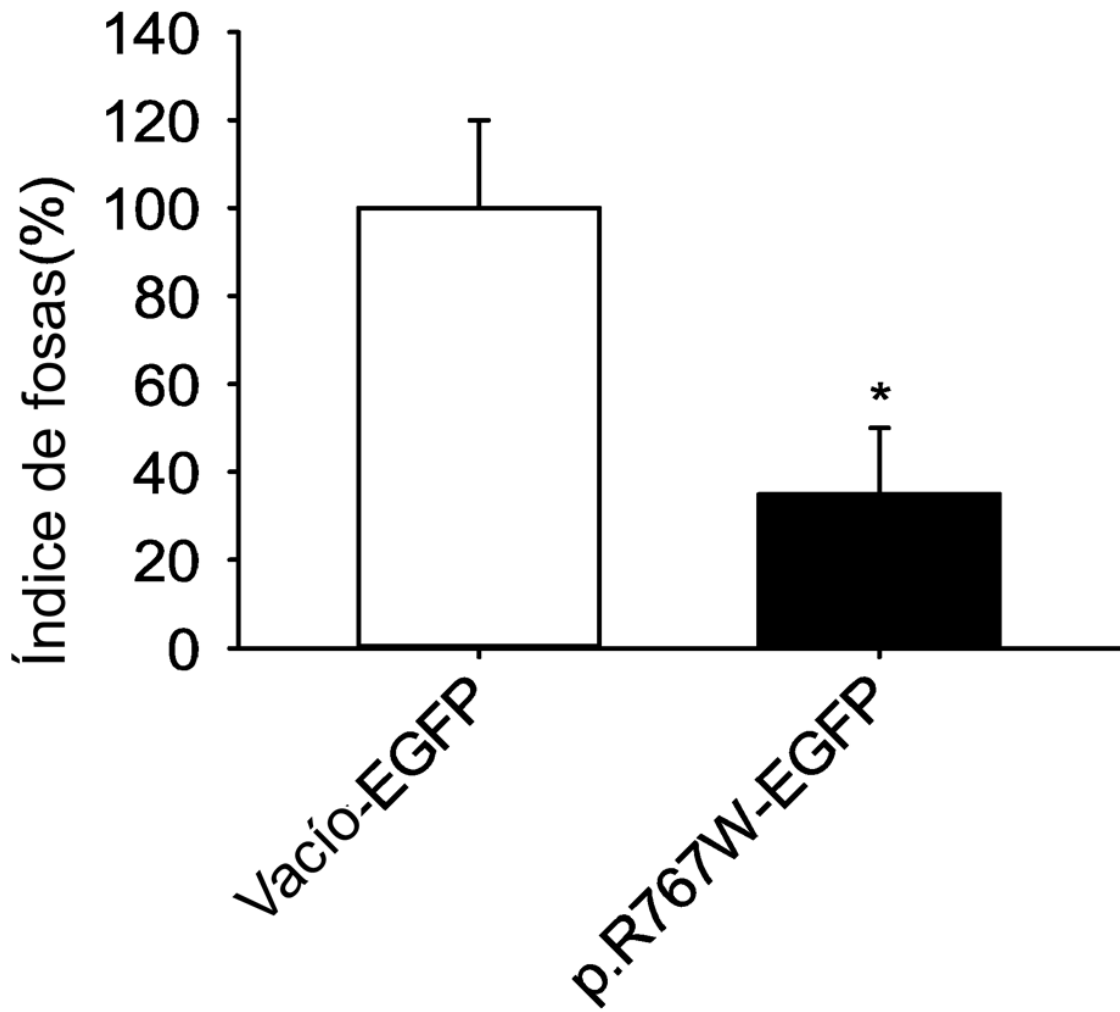


Figura 5

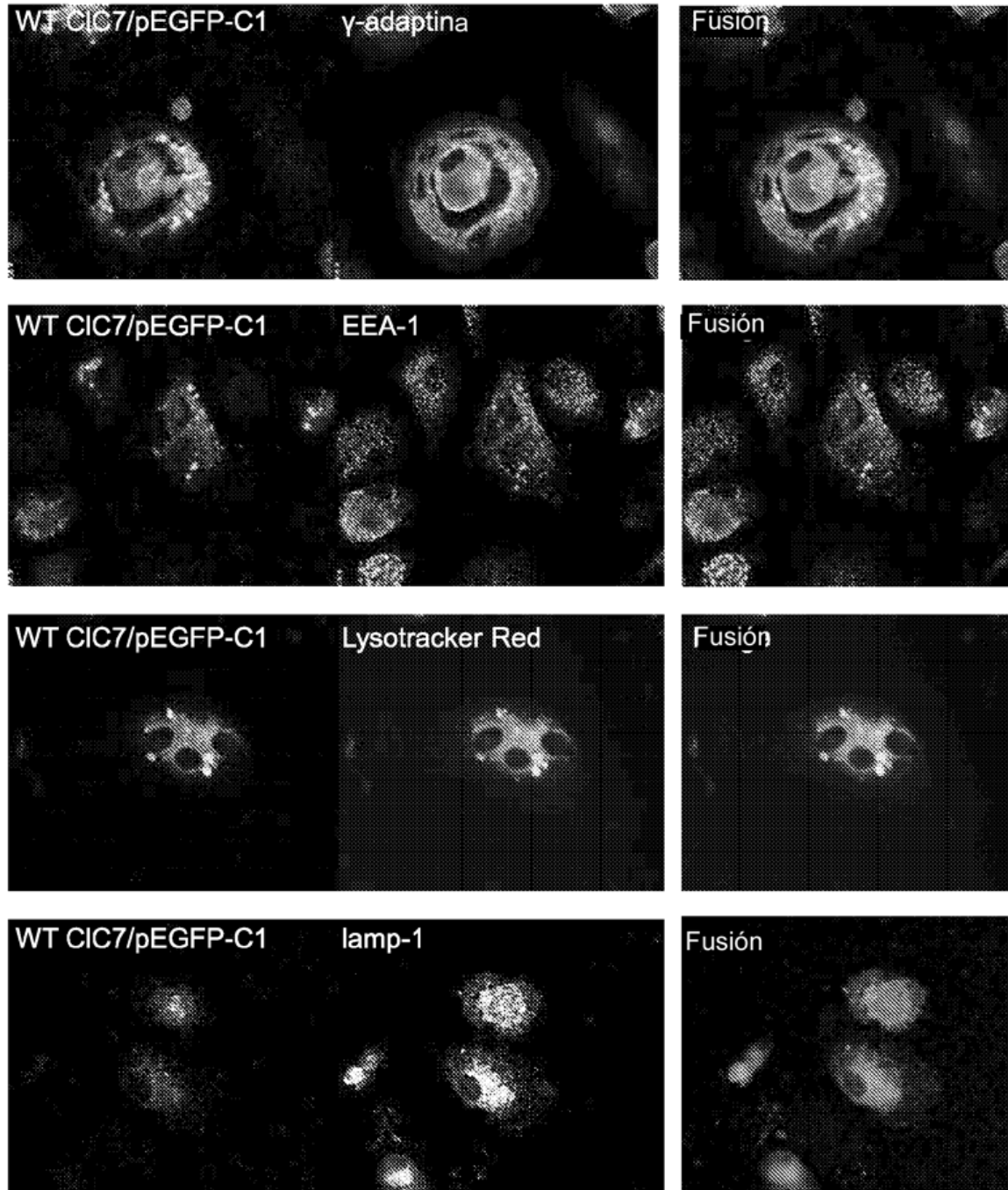


Figura 6

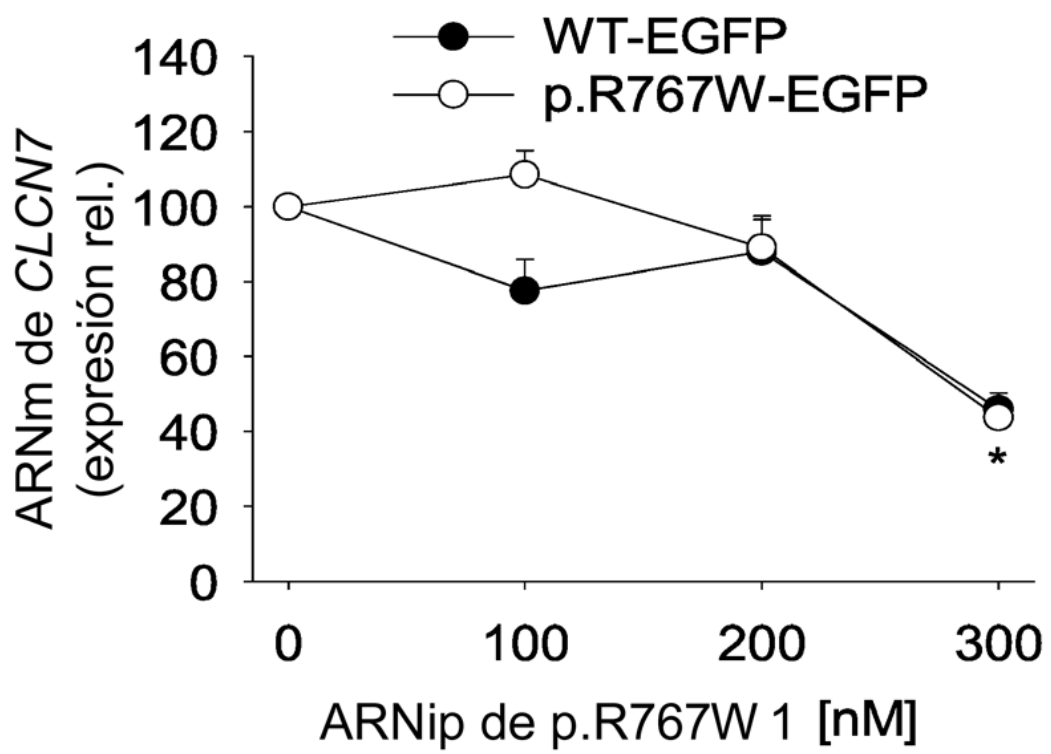


Figura 7



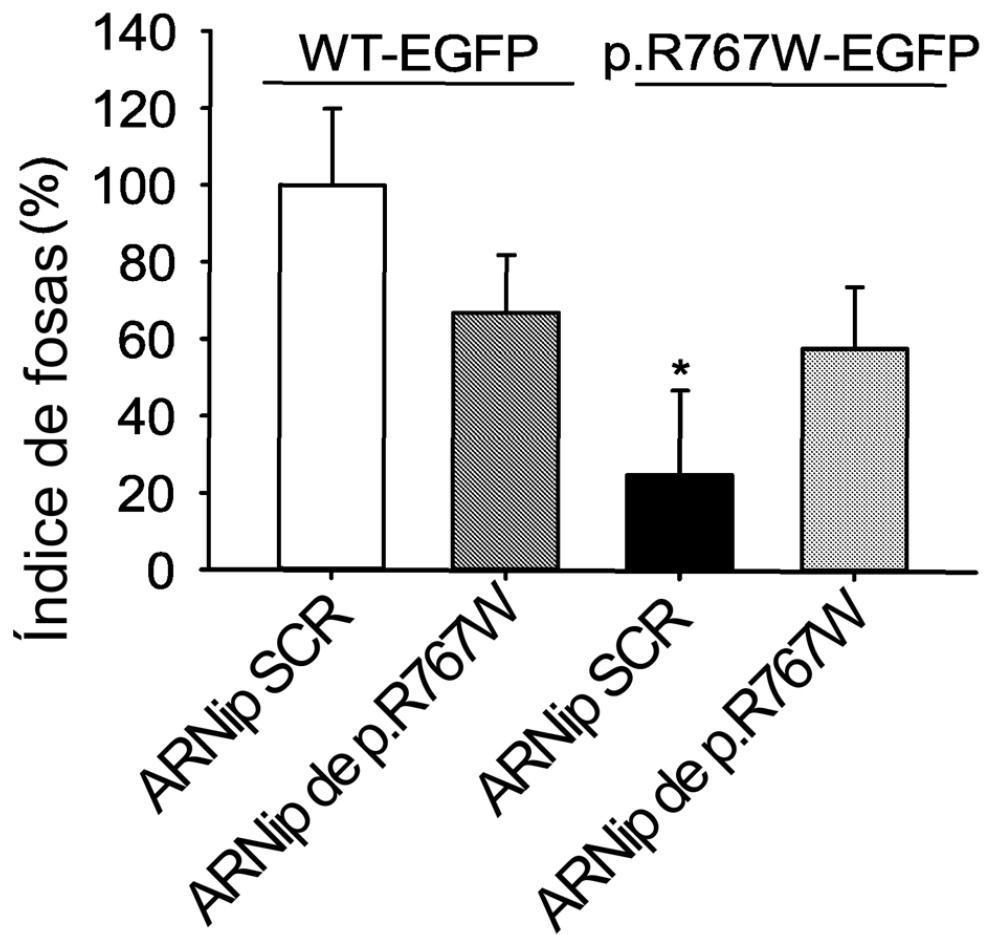


Figura 8

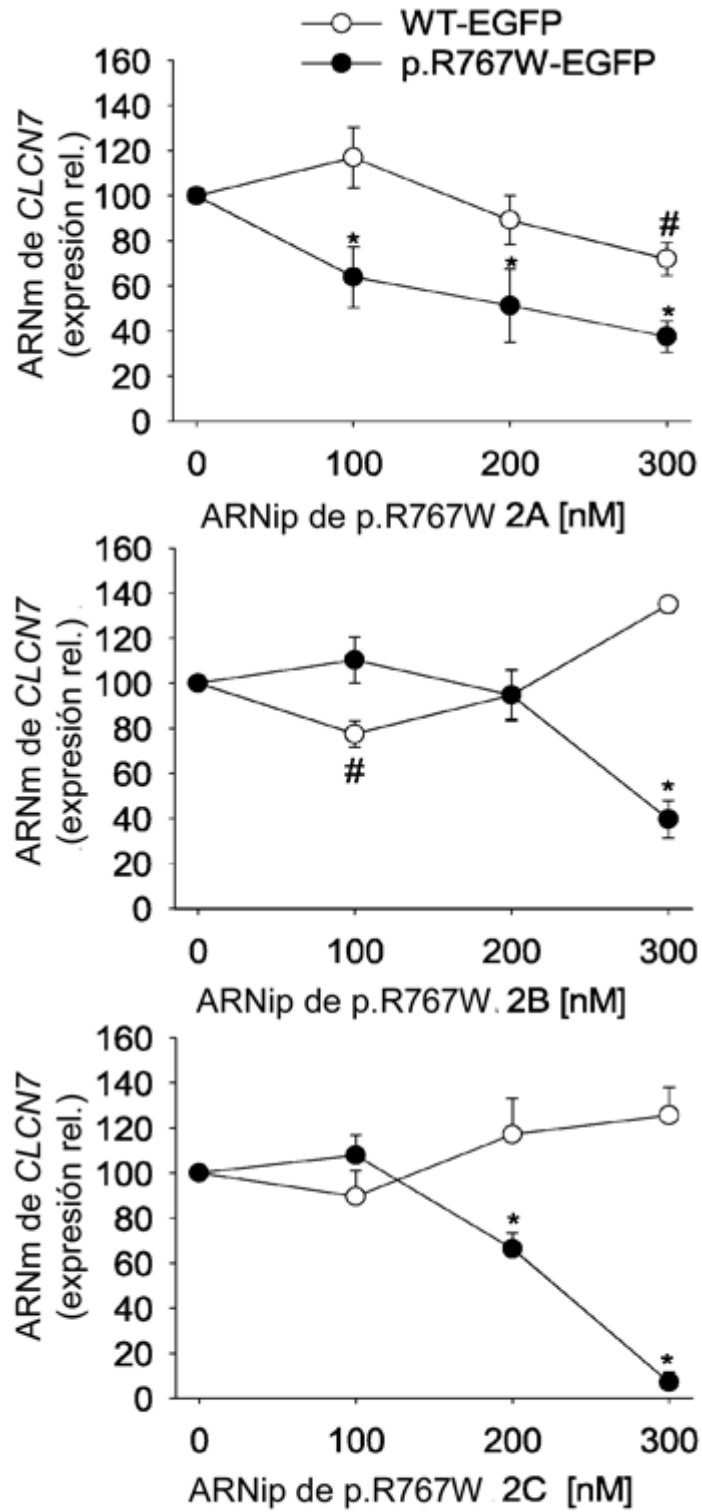


Figura 9

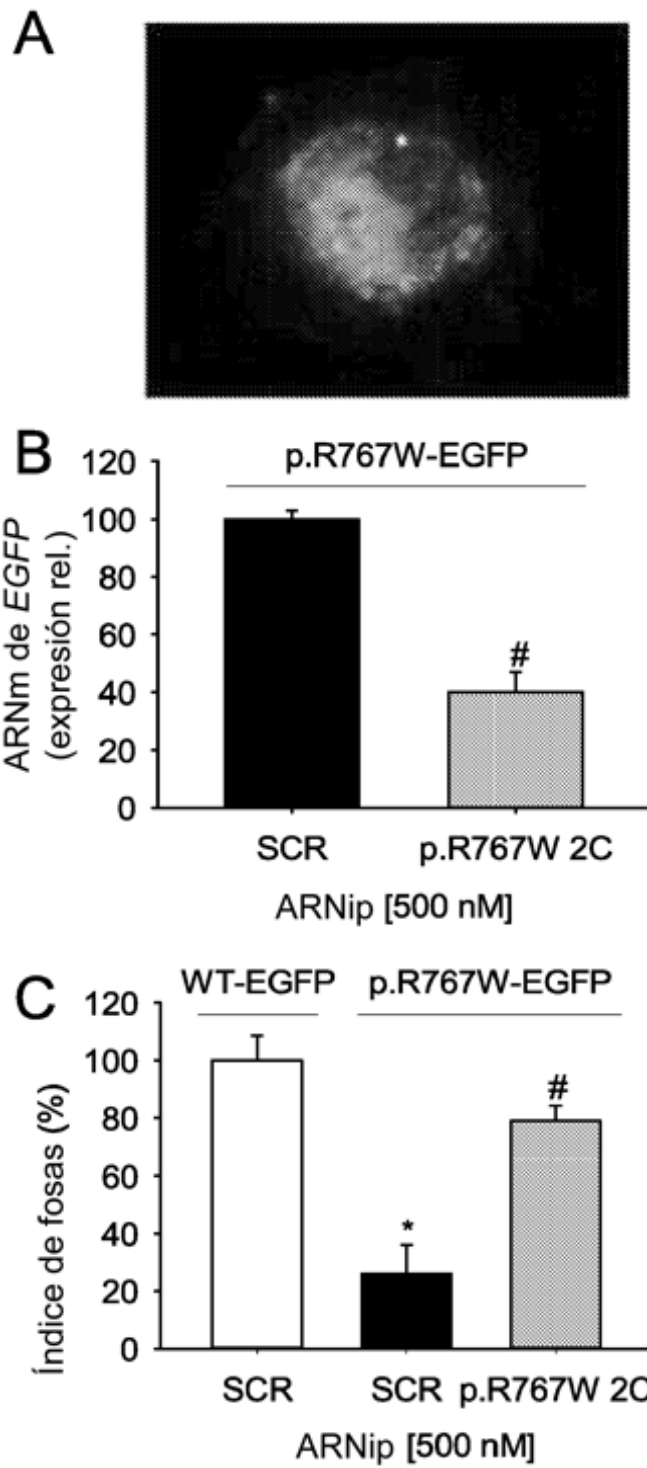


Figura 10

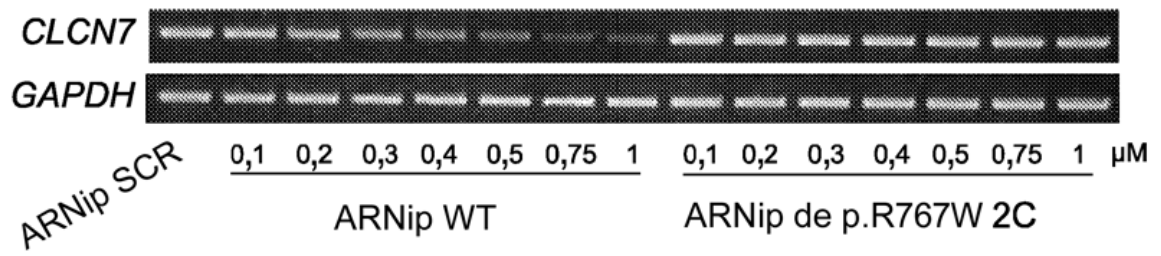


Figura 11

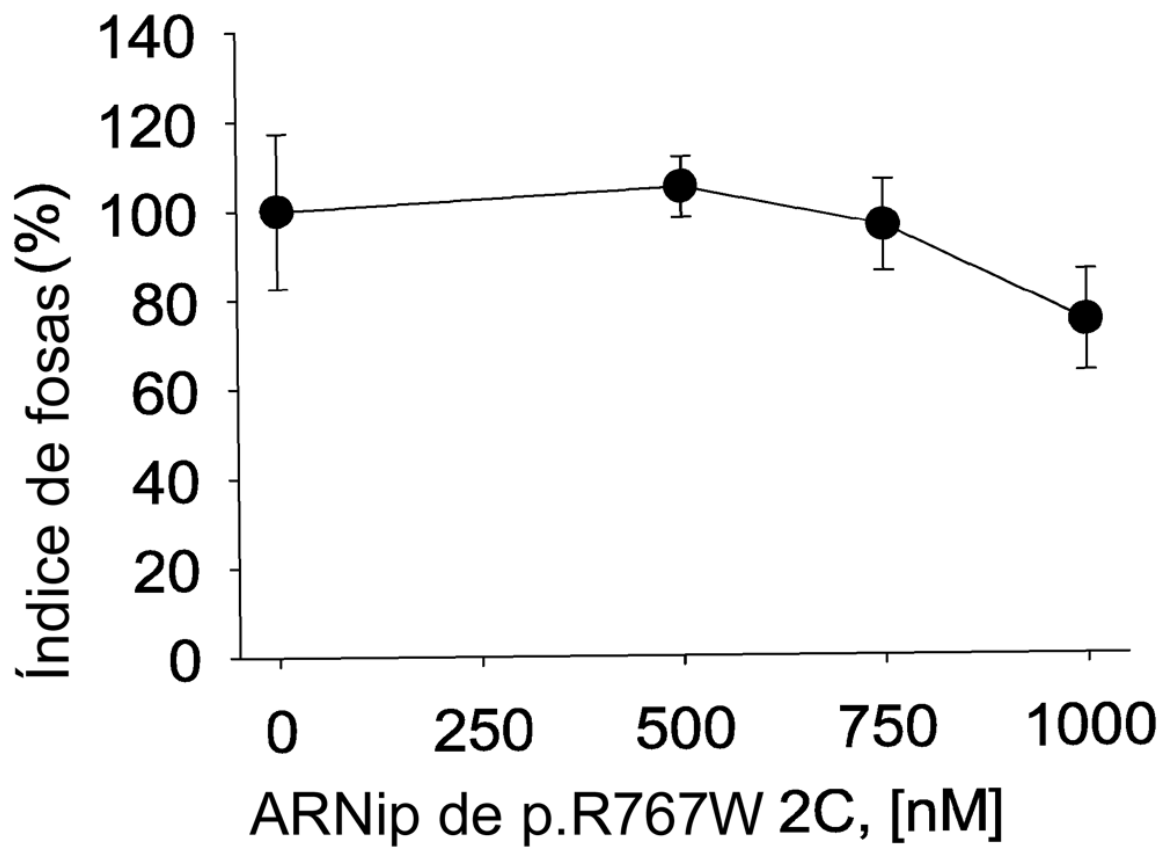


Figura 12

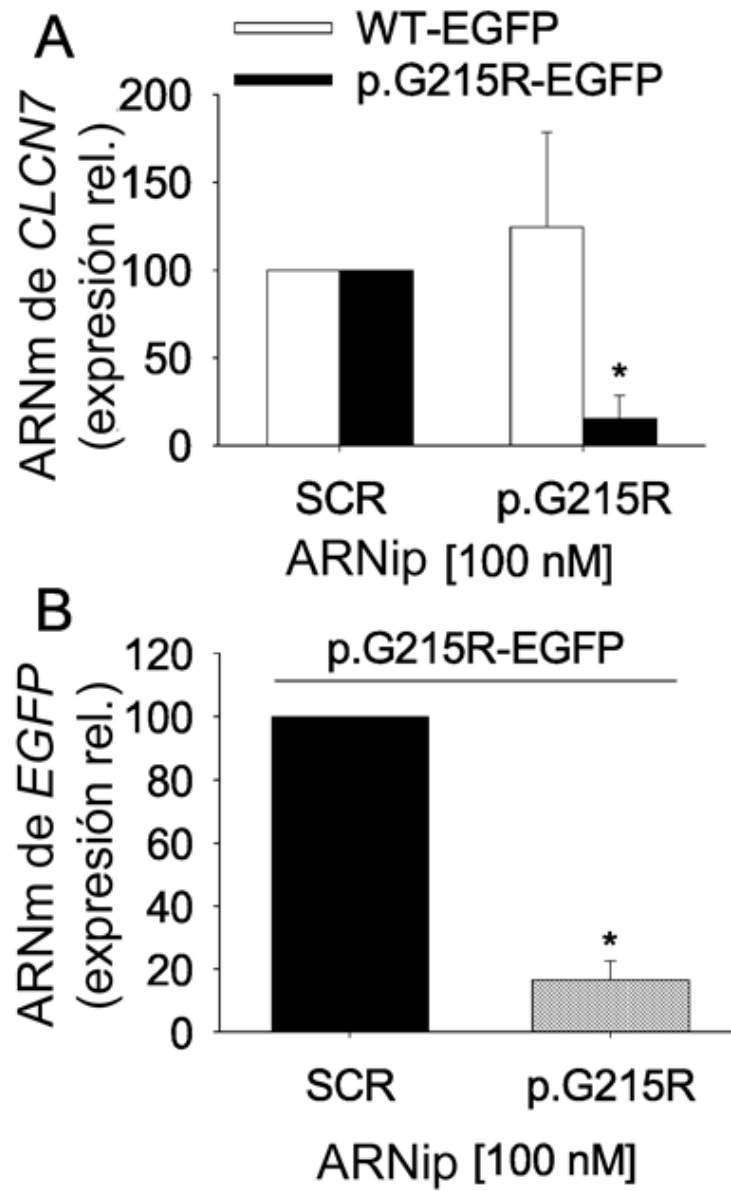


Figura 13

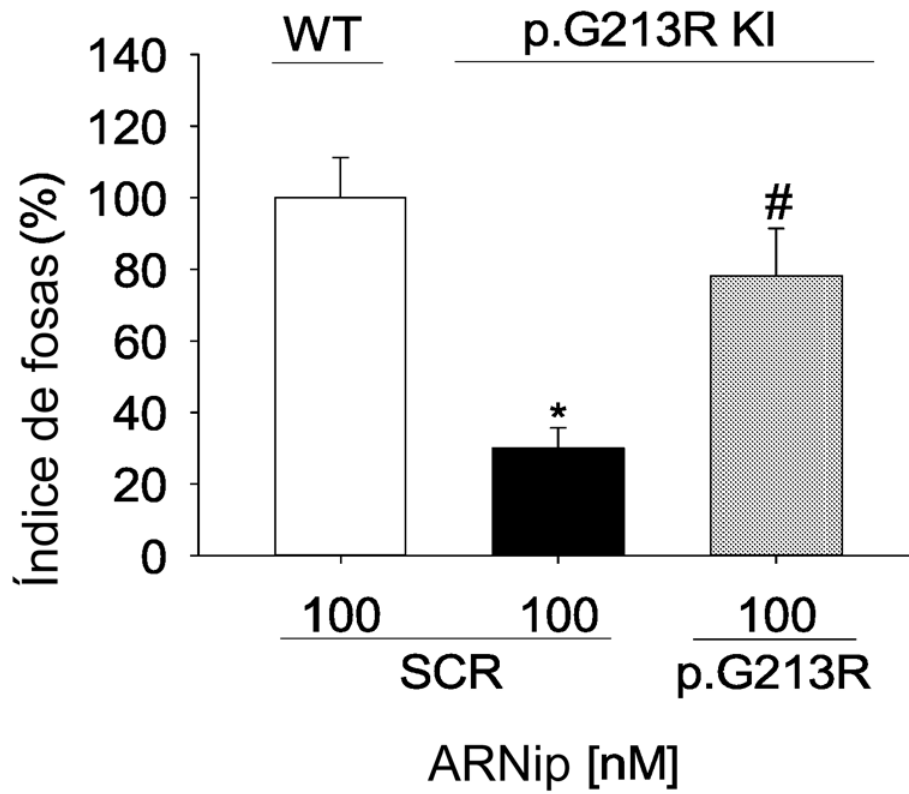


Figura 14

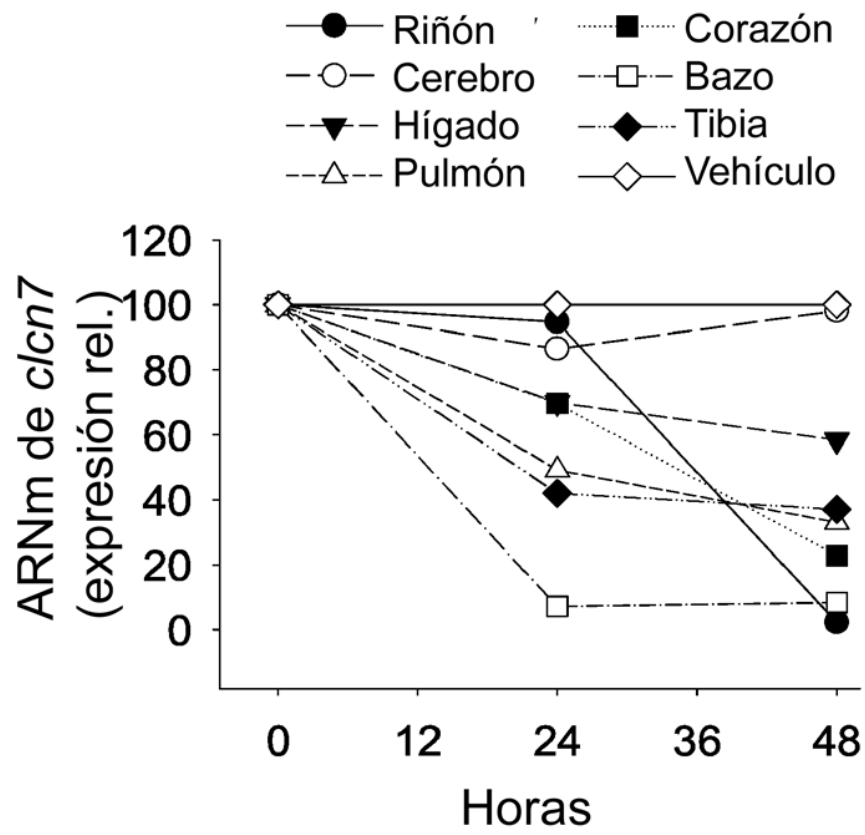


Figura 15



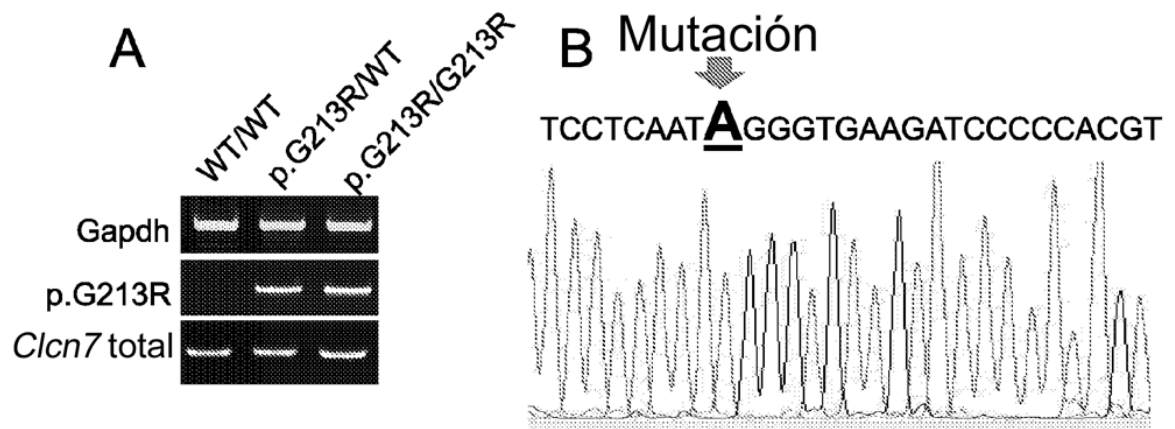


Figura 16

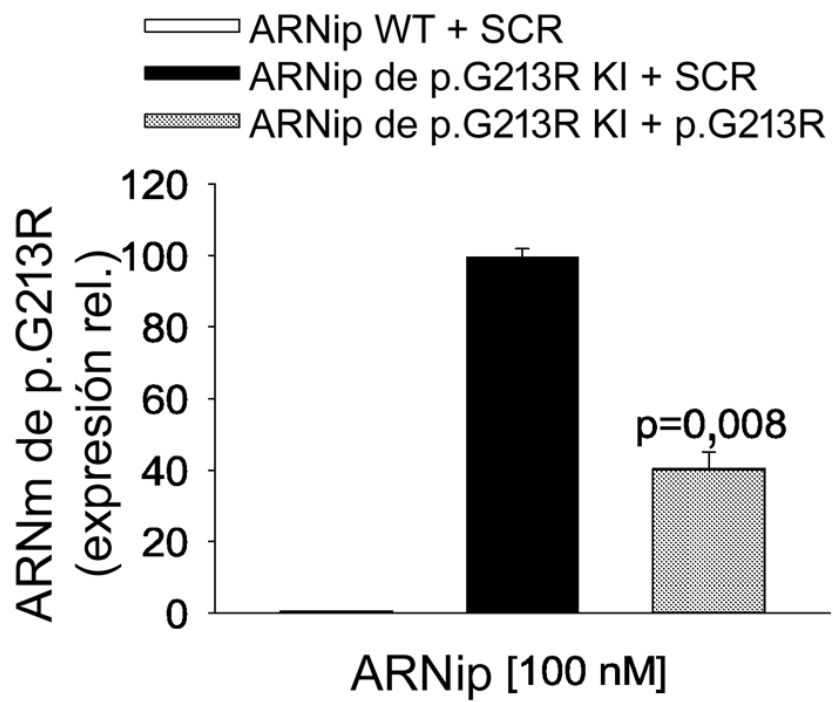


Figura 17

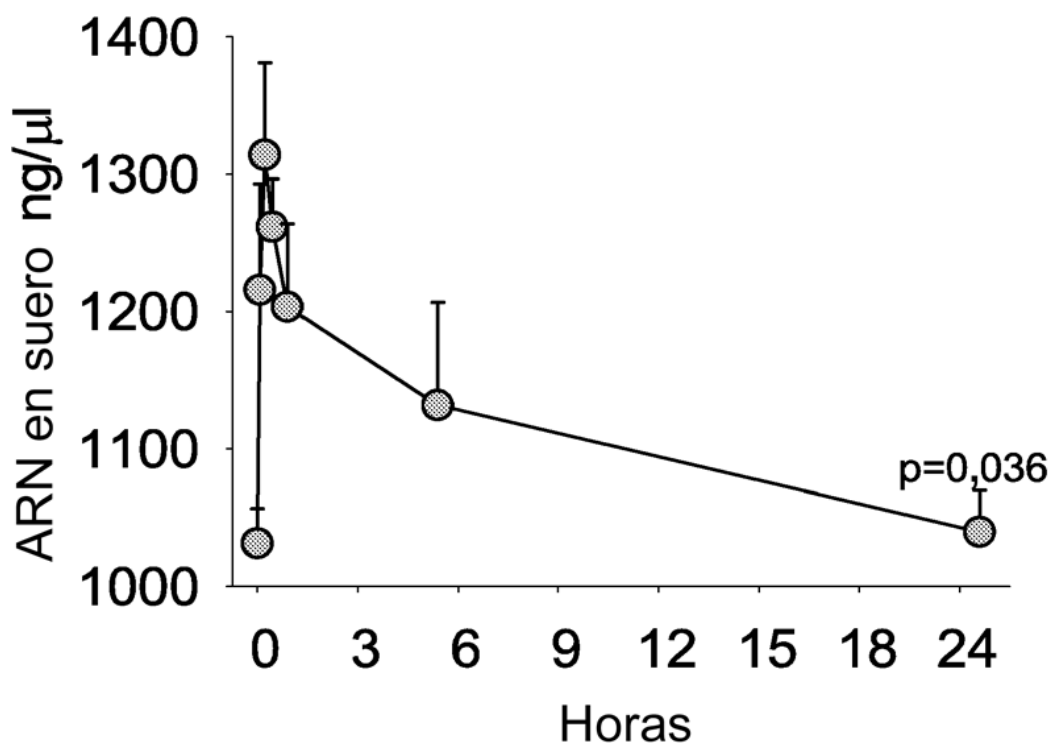


Figura 18

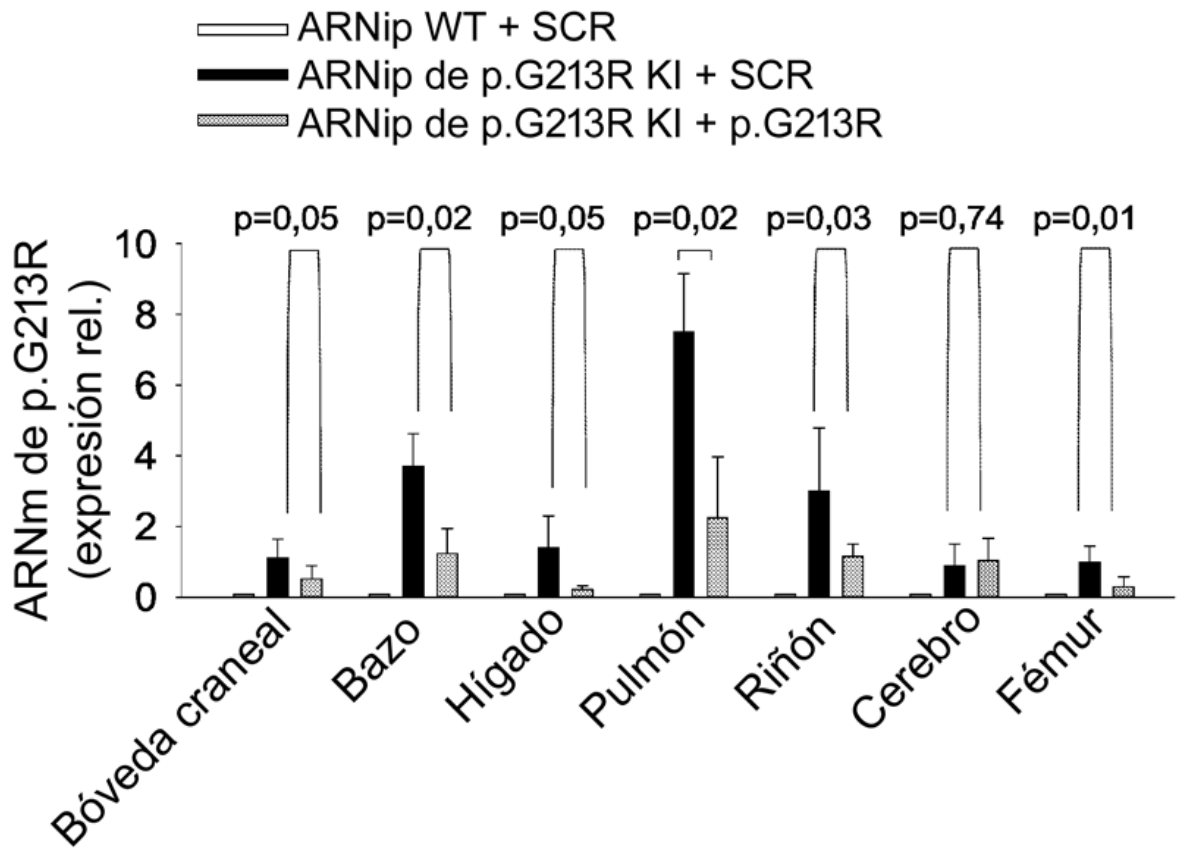


Figura 19

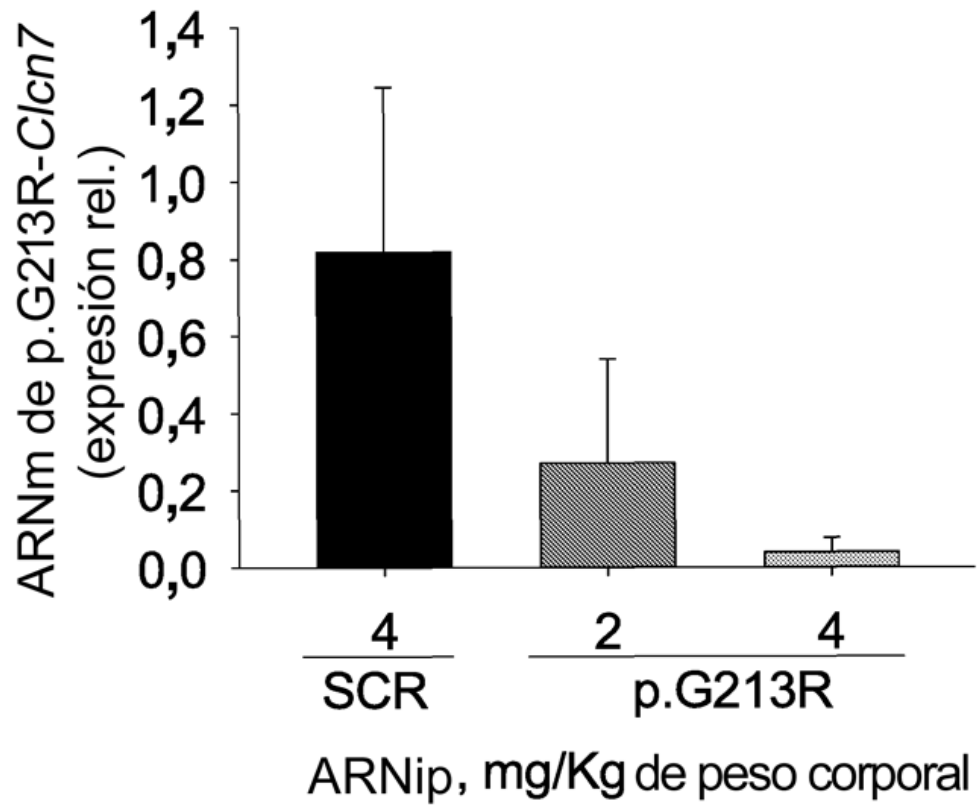


Figura 20

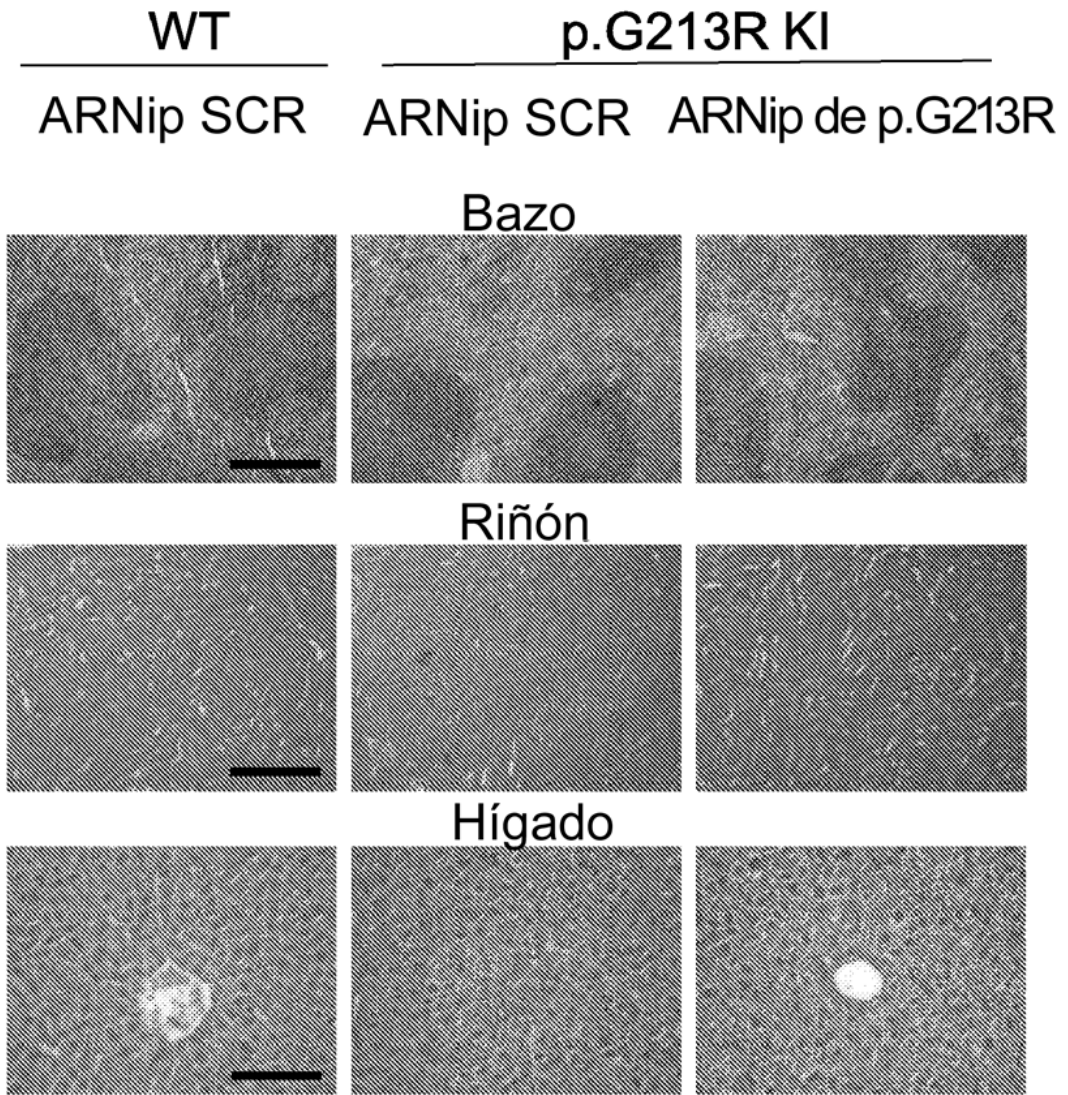


Figura 21

- ARNip WT + SCR
- ARNip de p.G213R KI + p.G213R

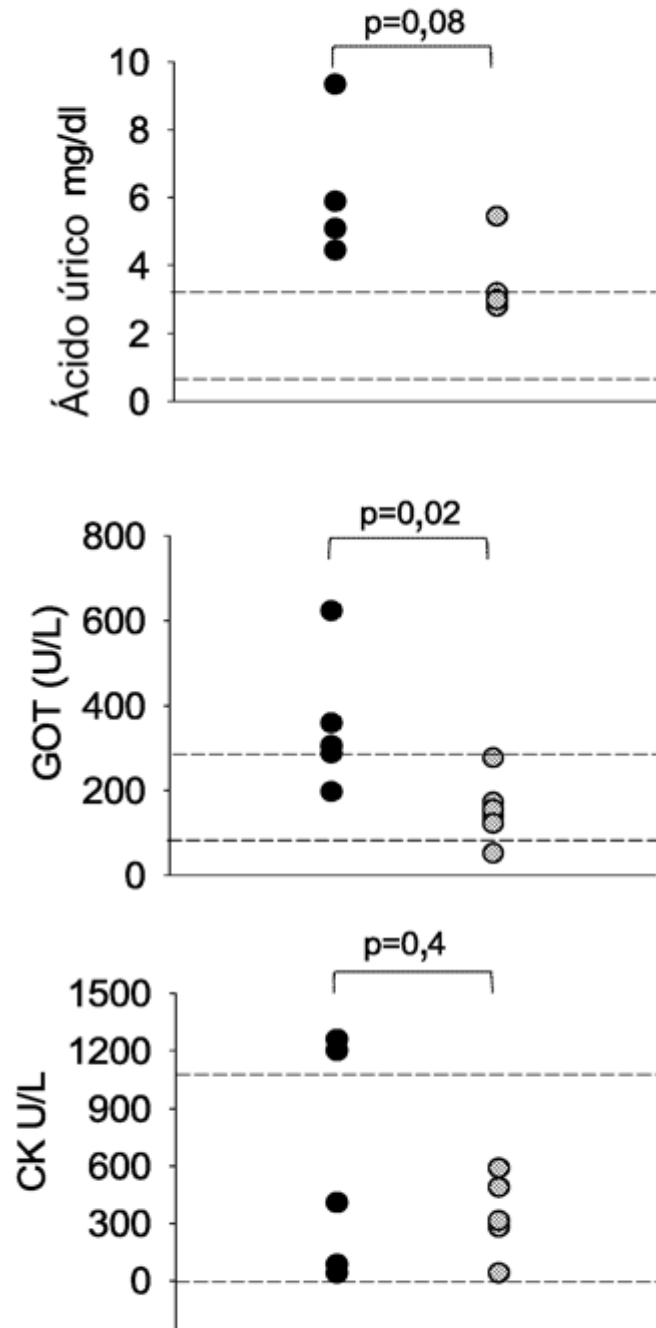


Figura 22

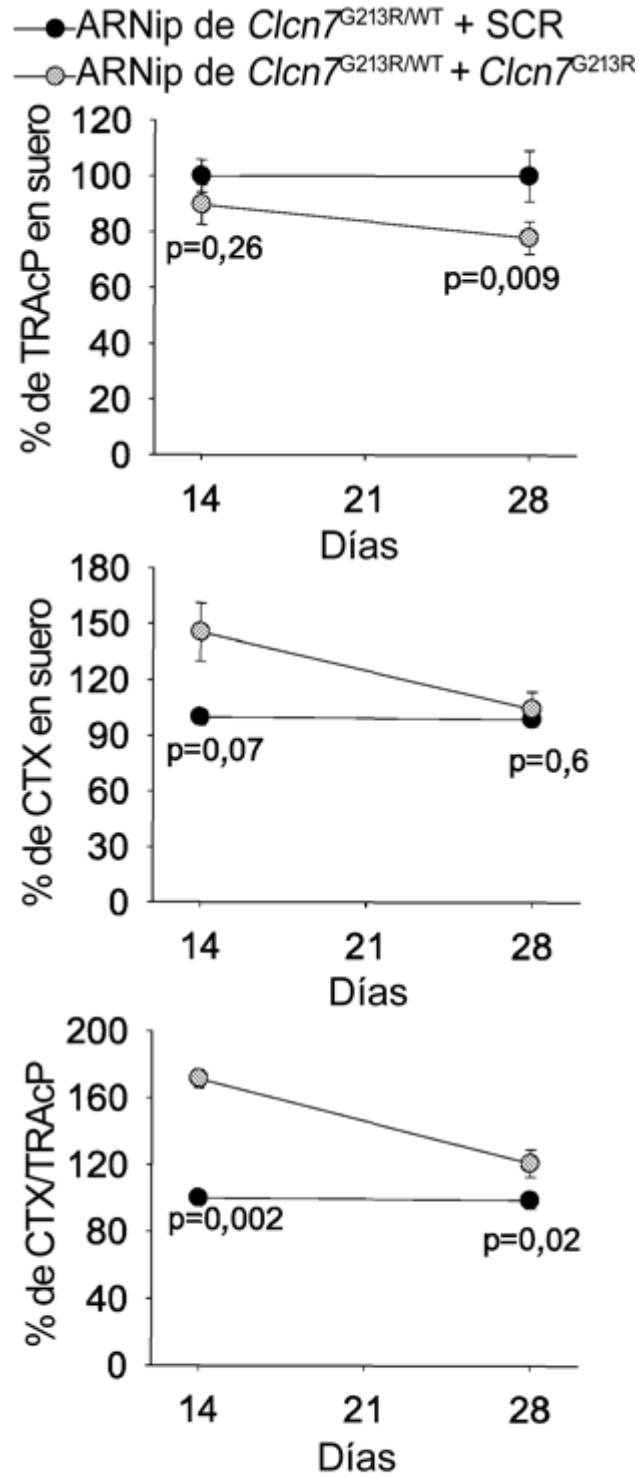


Figura 23



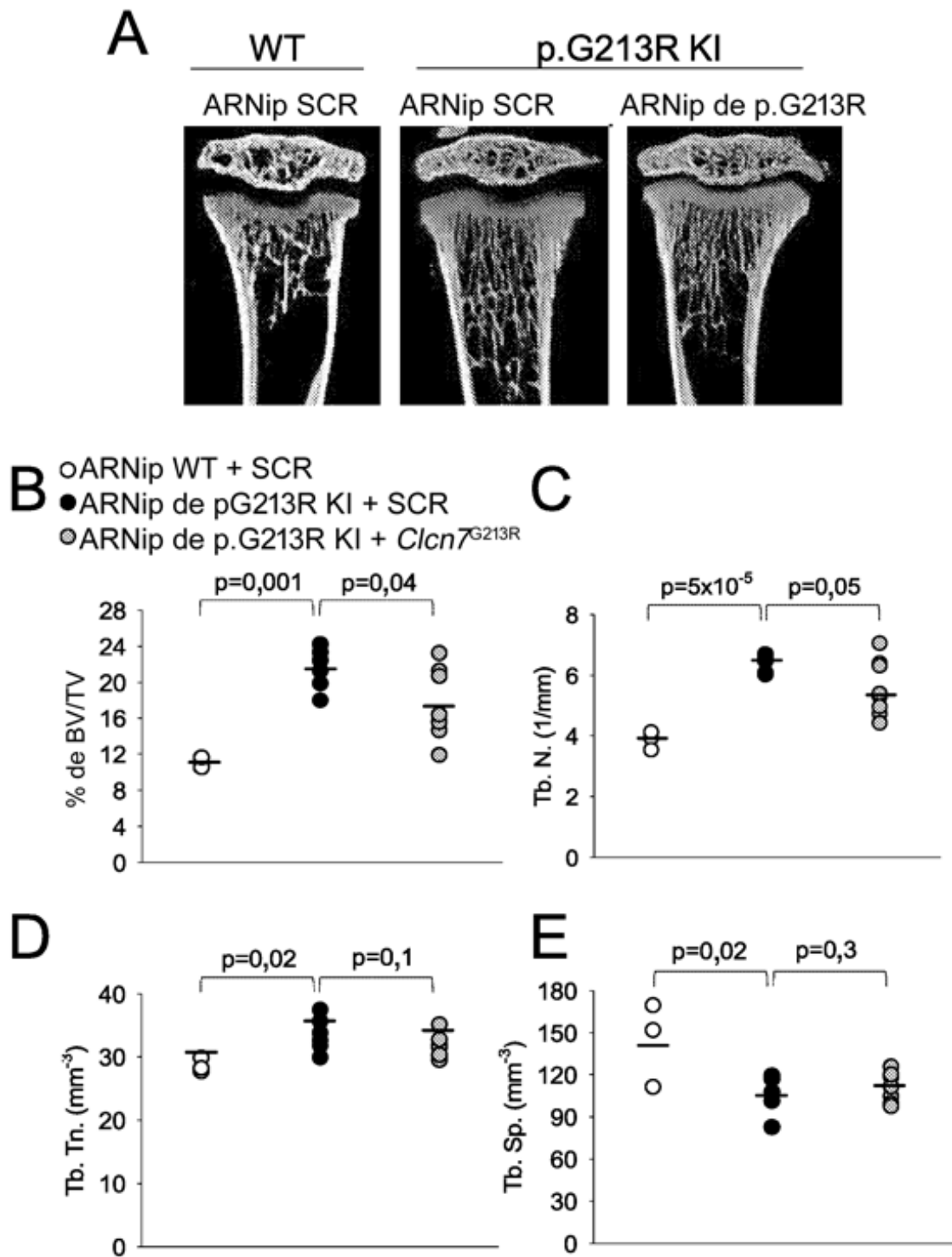


Figura 24

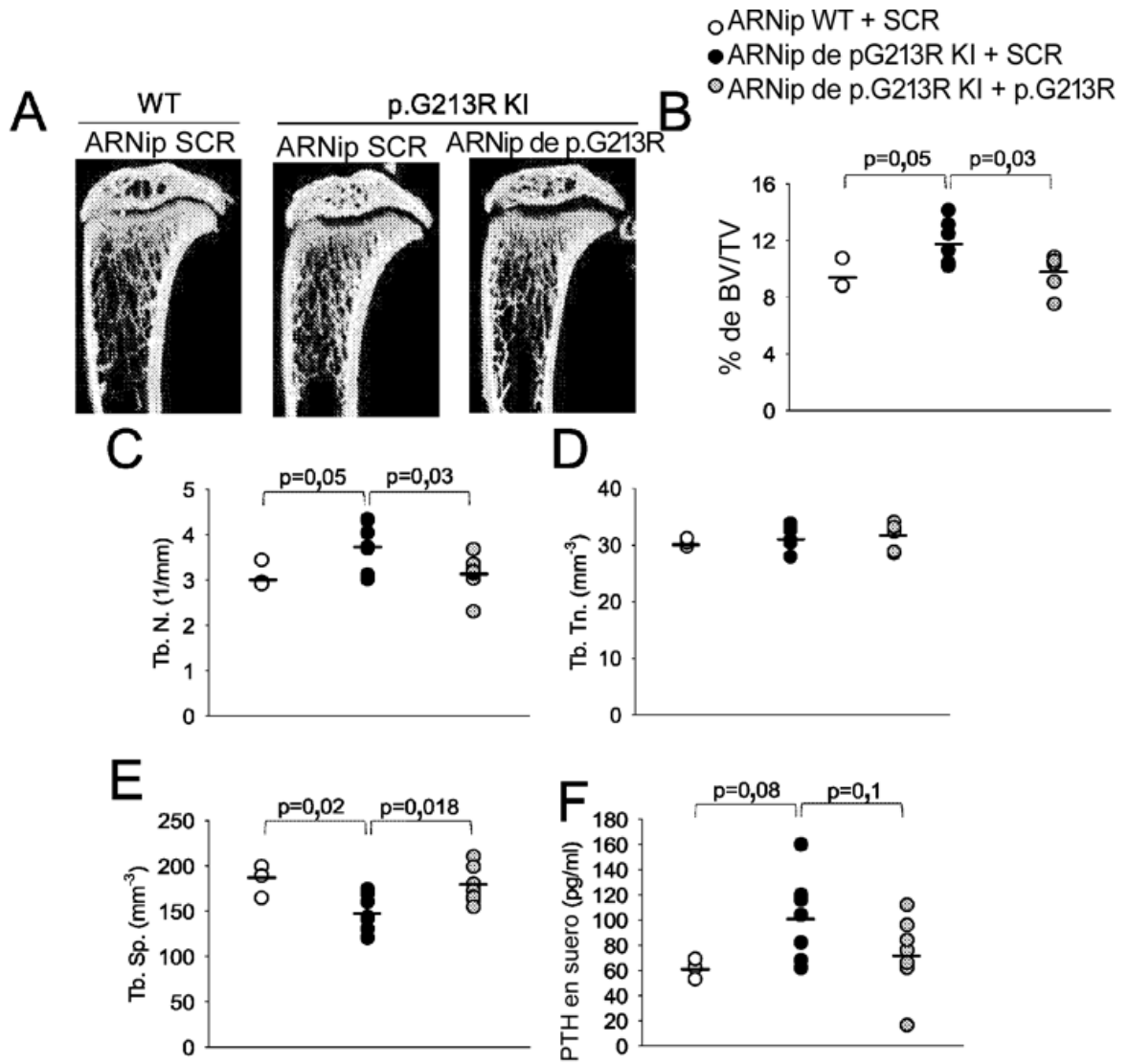


Figura 25

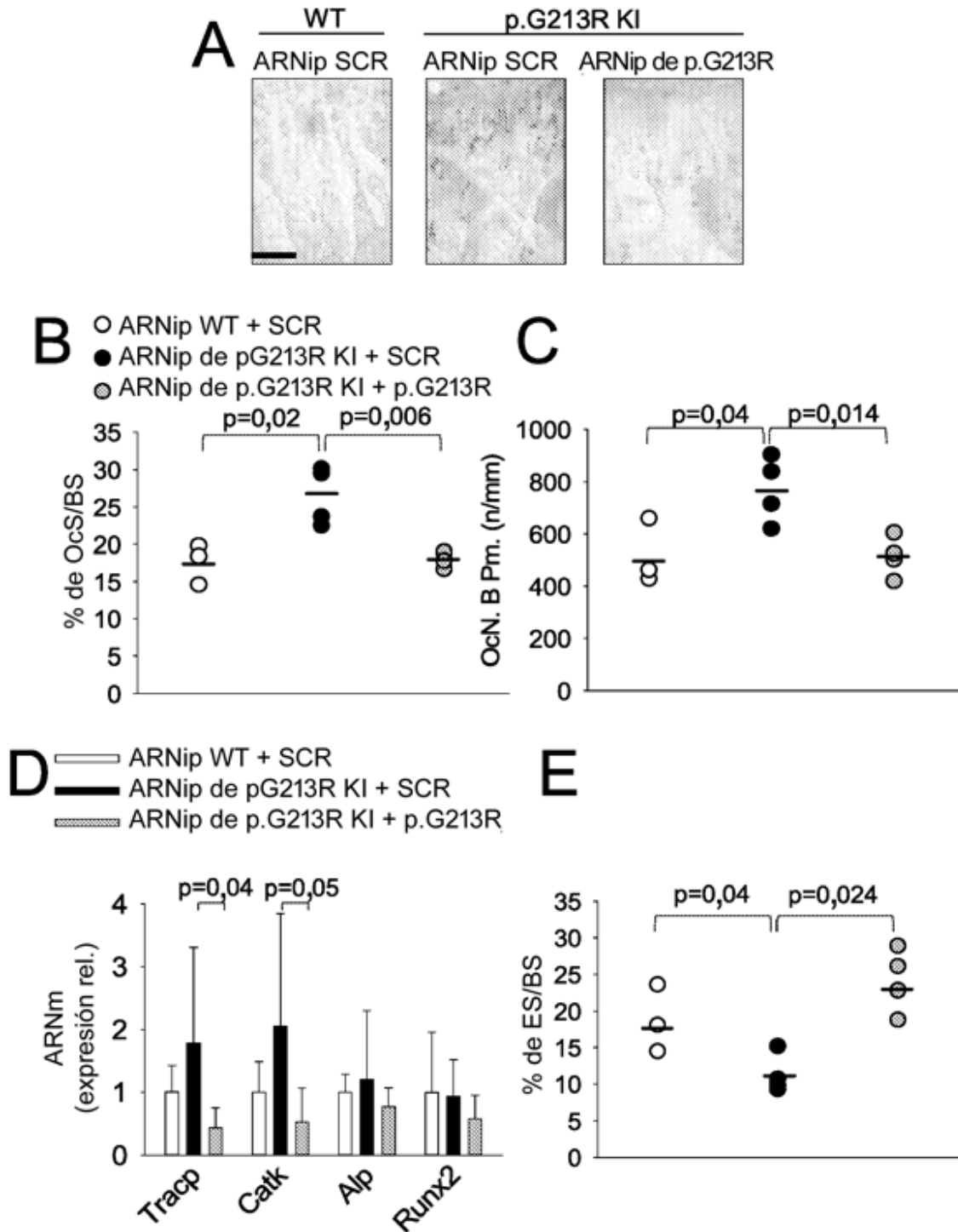


Figura 26

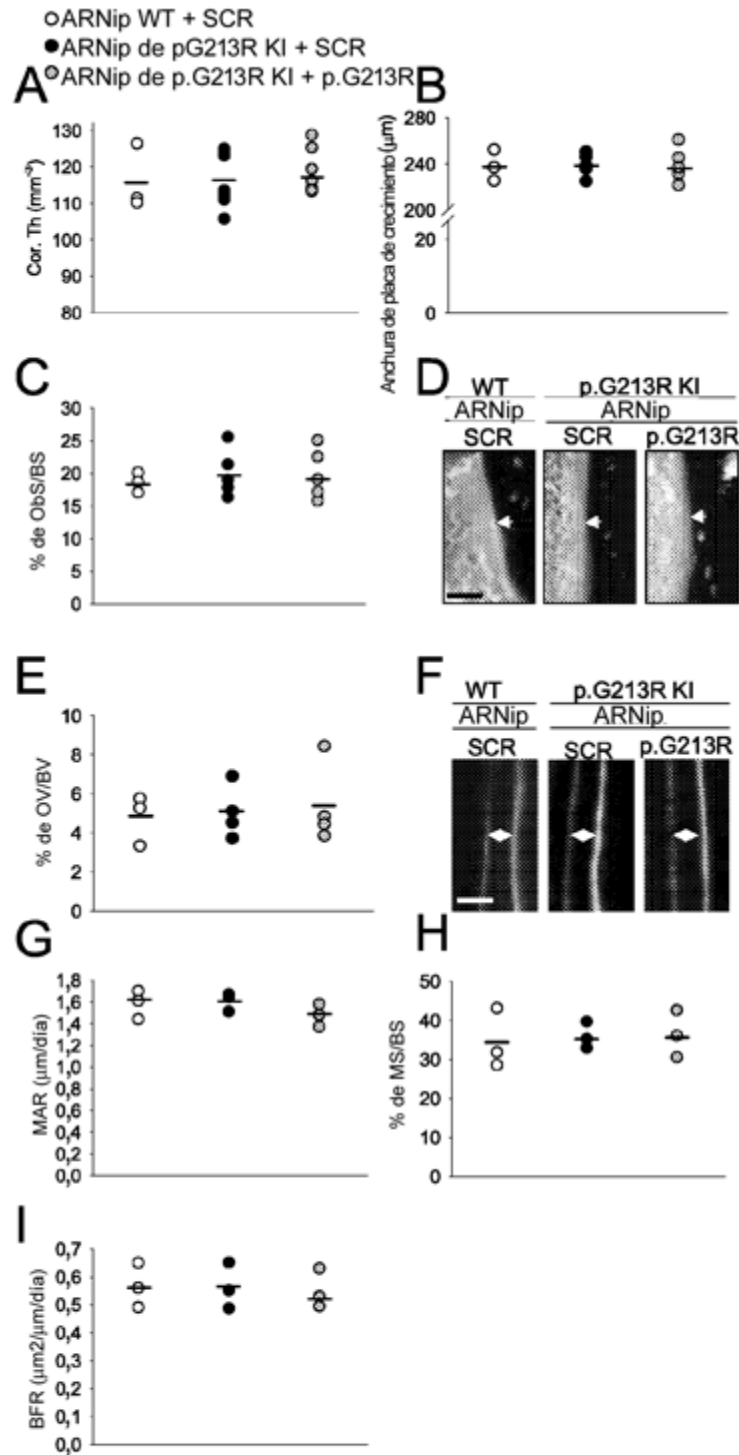


Figura 27

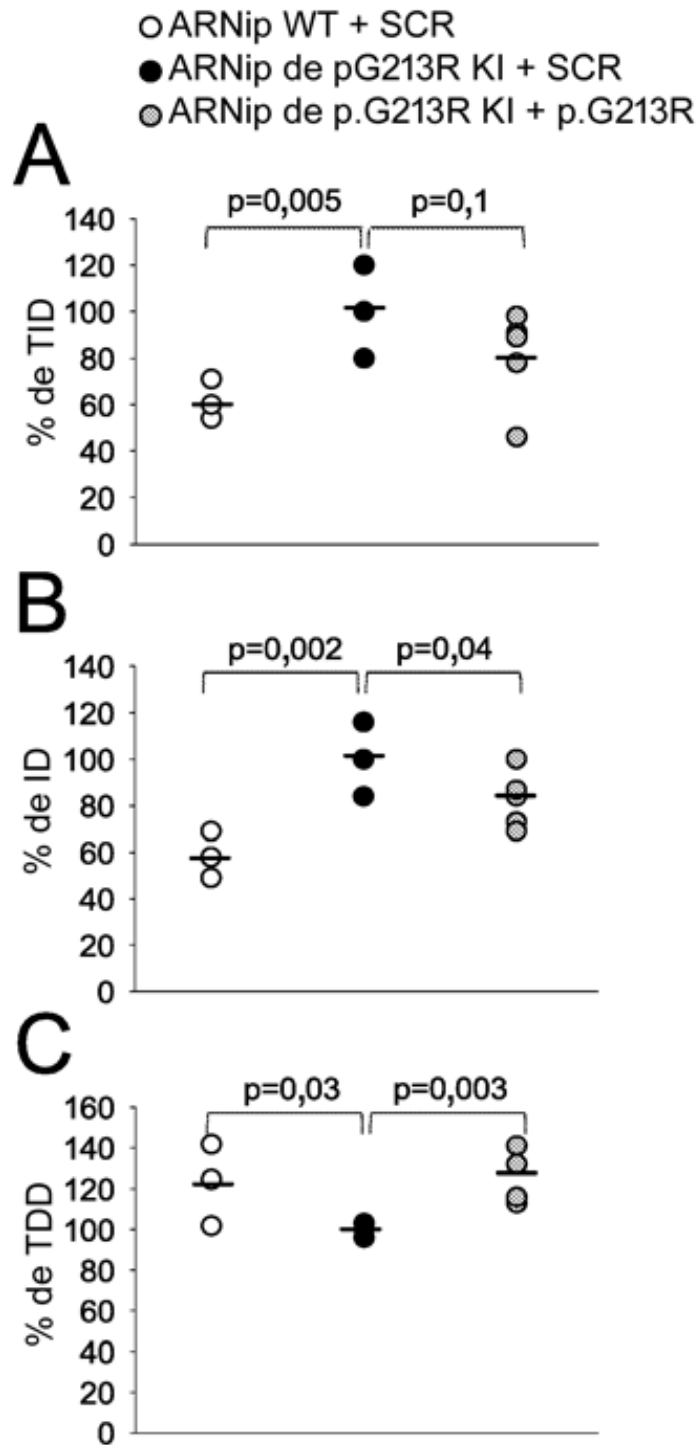


Figura 28

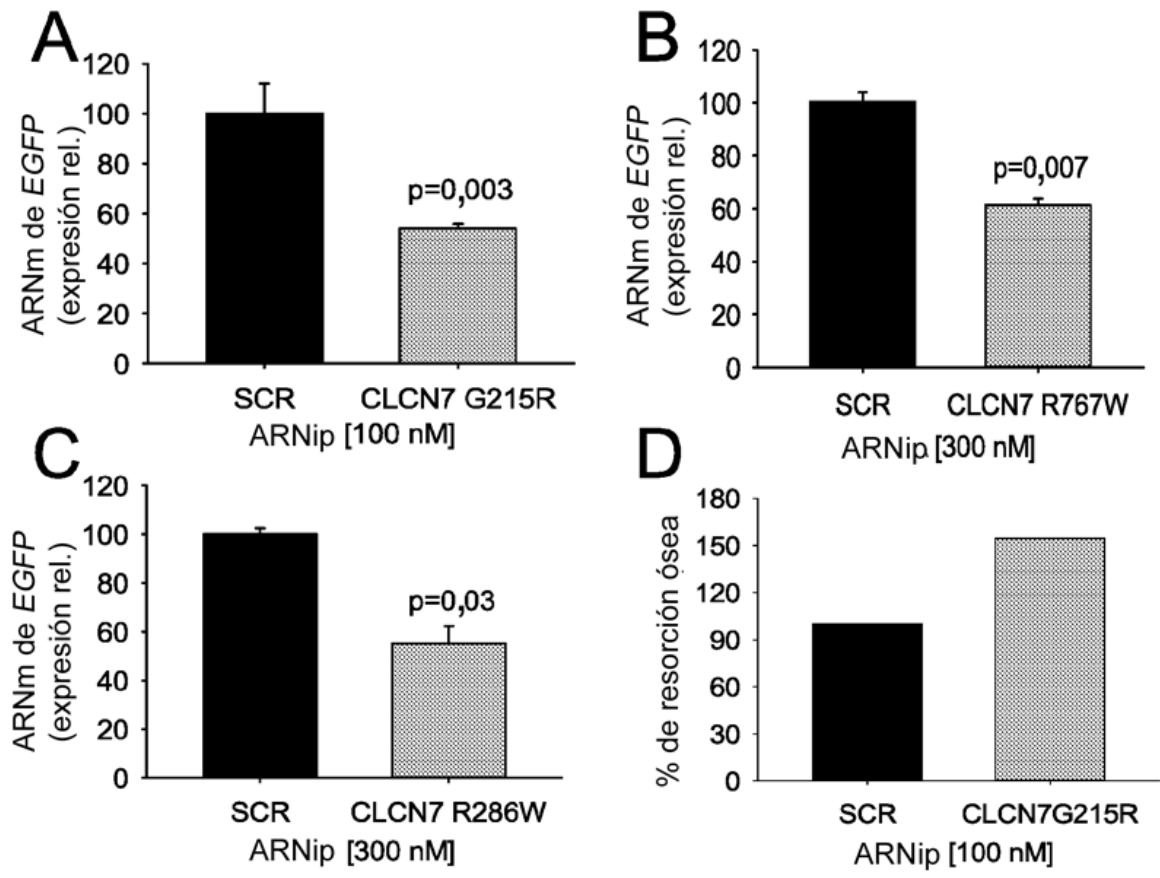


Figura 29

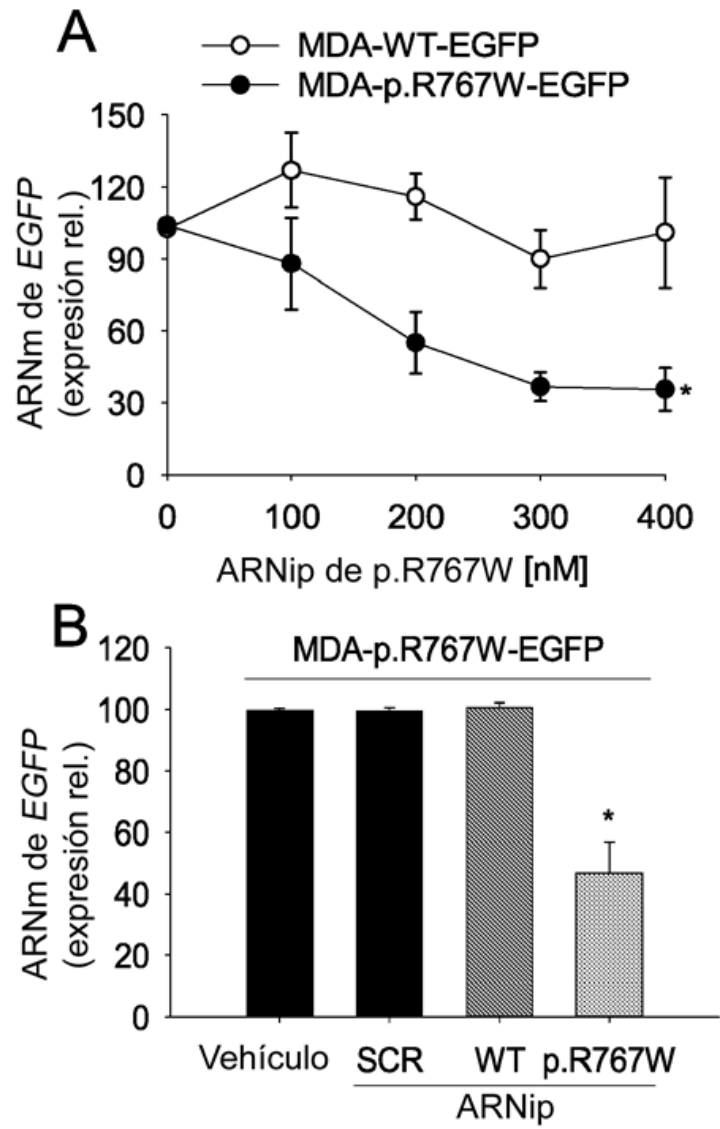


Figura 30

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

## 10 Literatura no patente citada en la descripción

- DENISE M KENSKI; GABOR BUTORA; AARRON T WILLINGHAM; ABBY J COOPER; WENLANG FU; NING QI; FERDIE SORIANO; IAN W DAVIES; W MICHAEL FLANAGAN. siRNA-opti-mized Modifications for Enhanced In Vivo Activity. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2012, vol. 1, e5
- MARK A. BEHLKE. Chemical Modification of siR-NAs for In Vivo Use. *Oligonucleotides*, 2008, vol. 18, 305-320
- PELLEDE et al. *Tissue Engineering: Part B*, 2010, vol.16 (1), 13-20
- EGERMANN et al. *Human Gene Ther.*, May 2006, vol. 17 (5), 507-17
- LUGINBUEHL et al. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, vol. 58, 197-208
- FANG et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 5753
- DENG Y; WANG CC; CHOY KW; DU Q; CHEN J; WANG Q; CHUNG TK; TANG T. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. *Gene*, 2014, vol. 538, 217-227
- J. BOLLERSLEV. Osteopetrosis, A genetic and epidemiological study. *Clin. Genet.*, 1987, vol. 31, 86-90
- O.D. BÉNICHOU; J.D. LAREDO; M.C. DE VERNEJOU. Type II autosomal dominant osteopetrosis (Albers-Schönberg disease): clinical and radiological manifestations in 42 patients. *Bone*, 2000, vol. 26, 87-93
- A. FRATTINI; A. PANGRAZIO; L. SUSANI; C. SOBACCHI; M. MIROLO; M. ABINUN; M. ANDOLINA; A. FLANAGAN; E.M. HORWITZ; E. MIHAI. Chloride channel CICN7 mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J. Bone Miner. Res.*, 2003, vol. 18, 1740-1747
- B. PERUZZI; A. TETI. The physiology and pathophysiology of the osteoclast. *Clin Rev Bone Miner Metab.*, 2012, vol. 10, 71-97
- A. DEL FATTORE; B. PERUZZI; N. RUCCI; I. RECCHIA; A. CAPPARIELLO; M. LONGO; D. FORTUNATI; P. BALLANTI; M. LACOBINI; M. LUCIANI. Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment. *J. Med. Genet.*, 2006, vol. 43, 315-325
- K. CHU; D.L. KOLLER; R. SNYDER; T. FISHBURN; D. LAI; S.G. WAGUESPACK; T. FOROUD; M.J. ECONS. Analysis of variation in expression of autosomal dominant osteopetrosis type 2: searching for modifier genes. *Bone*, 2005, vol. 37, 655-661
- E. CLEIREN; O. BÉNICHOU; E. VAN HUL; J. GRAM; J. BOLLERSLEV; F.R. SINGER; K. BEAVERSON; A. ALEDO; M.P. WHYTE; T. YONEYAMA. Albers-Schönberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CICN7 chloride channel gene. *Hum. Mol. Genet.*, 2001, vol. 10, 2861-2867
- U. KORNAK; D. KASPER; M.R. BÖSL; E. KAISER; M. SCHWEIZER; A. SCHULZ; W. FRIEDRICH; G. DELLING; T.J. JENTSCH. Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 2001, vol. 104, 205-215
- A. DEL FATTORE; M. CAPANNOLO; N. RUCCI; A. TETI. New experimental therapeutic approach by siRNA for autosomal dominant osteopetrosis (ADO). *Bone*, 2010, vol. 46, 142
- Y. OHNISHI; Y. TAMURA; M. YOSHIDA; K. TOKUNAGA; H. HOHJOH. H. Enhancement of allele discrimination by introduction of nucleotide mismatches into siRNA in allele-specific gene silencing by RNAi. *PLoS ONE.*, 2008, vol. 3, e2248
- I. ALAM; A.K. GRAY; K. CHU; S. ICHIKAWA; K.S. MOHAMMAD; M. CAPANNOLO; M. CAPULLI; A. MAURIZI; M. MURACA; A. TETI. Generation of the first autosomal dominant osteopetrosis type II (ADO2) disease models. *Bone*, 2014, vol. 59, 66-75