

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 054**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2012 E 17192704 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 3279324**

54 Título: **Tratamiento de salto de exones para epidermólisis ampollosa distrófica**

30 Prioridad:

11.10.2011 EP 11306316

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

20.10.2021

73 Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (25.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

UNIVERSITÉ DE PARIS (25.0%);

ASSOCIATION FRANÇAISE CONTRE LES

MYOPATHIES (AFM) (25.0%) y

ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS

(APHP) (25.0%)

72 Inventor/es:

HOVNANIAN, ALAIN;

TITEUX, MATTHIAS y

TURCZYNSKI, SANDRINA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 867 054 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

Tratamiento de salto de exones para epidermólisis ampollosa distrófica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de epidermólisis ampollosa distrófica. Particularmente, se usa la estrategia de salto de exones.

10 **Antecedentes de la invención**

La epidermólisis ampollosa es un grupo de trastornos mecanoampollosos hereditarios caracterizados por fragilidad de la piel dentro de la zona de la membrana basal cutánea, con considerable heterogeneidad clínica y genética, heredada de una forma dominante autosómica o recesiva autosómica. Tradicionalmente, la EB se ha dividido en tres categorías amplias basándose en el nivel de separación tisular, determinada por microscopia electrónica de diagnóstico y/o identificación de inmunopéptidos (Fine *et al.*, 2000): las formas simples de EB (EBS) demuestran separación tisular dentro de los queratinocitos basales en la capa inferior de la epidermis; las formas de unión de EB (JEB) presentan escisión dentro de la lámina lúcida en la membrana basal dermoepidérmica; y en las formas distróficas (DEB), se producen separación tisular por debajo de la lámina densa dentro de la dermis papilar superior (Varki *et al.*, 2007).

La DEB está causada por mutaciones en *COL7A1* (OMIM *120120), en la región cromosómica 3p21, que codifica el colágeno de tipo VII. Se hereda de forma dominante o recesiva. La forma recesiva, RDEB (OMIM n.º 226600) es una de las genodermatosis más graves en niños y adultos jóvenes. La forma dominante DDEB (OMIM n.º 131750) es habitualmente menos grave. Los pacientes con DEB padecen desde el nacimiento de pérdida de adhesión entre la epidermis y la dermis provocando una grave formación de ampollas de la piel y la mucosa después de traumatismo leve. La enfermedad da lugar a complicaciones locales y sistémicas graves, y el pronóstico es malo a causa del riesgo aumentado de cáncer de piel agresivo. De hecho, más de un 50% de los individuos afectados morirá antes de la edad de 40 años directamente debido a carcinoma escamocelular metastásico (Fine *et al.*, 2000). Hay 4 subtipos de RDEB: el tipo generalizado grave (Hallopeau-Siemens) que es el más grave, la forma no grave generalizada (mitis), la forma inversa (que implica principalmente los pliegues) y la forma centrípeta (localizada). Todas estas variantes clínicas están causadas por pérdida de mutaciones de función en *COL7A1*, que provoca defectos estructurales en las fibrillas de anclaje (Hilal *et al.*, 1993; Hovnanian *et al.*, 1992). El colágeno de tipo VII es el componente principal de las fibrillas de anclaje que son estructuras de adhesión clave para la adhesión dermoepidérmica.

El colágeno de tipo VII se sintetiza como un precursor de proteína de 290 kDa. La proteína tiene una estructura cuaternaria homotrimérica, y cada una de las tres cadenas $\alpha 1$ idénticas consiste en tres dominios principales: el dominio globular de 130 kDa no colagenoso 1 (NC1) en el extremo amino, el dominio colagenoso helicoidal de 140 kDa y el dominio no colagenoso pequeño 2 (NC2) en el extremo carboxi. En la matriz extracelular, el colágeno de tipo VII se ensambla además en dímeros antiparalelos, con las partes helicoidales unidas por disulfuro en un corto solapamiento del extremo carboxi que sitúa los dominios globulares del extremo amino en extremos opuestos. El dominio globular NC1 está codificado por los exones 2 a 27. El dominio colagenoso central está codificado por los exones 28 a 112 y se pliega en una triple hélice de colágeno interrumpida. La interrupción más grande en la secuencia colagenosa periódica Gly-X-X es el llamado segmento de bisagra, codificado por los exones 71 y 72. Con una estructura α -helicoidal predicha, se cree que confiere flexibilidad a la molécula. El dominio NC2 está codificado por los exones 113 a 118. El dominio NC2 es necesario para la trimerización de las cadenas $\alpha 1$ y para la dimerización antiparalela de los homotrímeros.

El gen que codifica el colágeno de tipo VII, *COL7A1*, está segmentado en 118 exones y se extiende sobre 32 kb en el cromosoma humano 3p21. Los exones más cortos son de 27 nucleótidos de longitud mientras que los más largos obtienen una longitud de 201 nucleótidos. El análisis informático de la secuencia genómica reveló que *COL7A1* es particularmente adecuado para la estrategia de salto de exones. Entre los 118 exones, los exones 28 a 112 están en fase, lo que significa que el salto de cualquiera de estos exones conservando al mismo tiempo la fase de lectura del ARNm es teóricamente factible.

No hay disponible ningún tratamiento específico para la epidermólisis ampollosa distrófica, pero la eliminación dirigida de exones realizando mutaciones recurrentes muestra potencial terapéutico.

TITEUX *et al.* (Human Gene Therapy, vol. 20, 2009, 668-669) divulga que el salto de los exones 73, 74 y 80 en *COL7A1* representa potencial terapéutico para tratar la epidermólisis ampollosa distrófica.

GOTO *et al.* (J. of Invest. Dermatol., vol. 126, 2006, 2614-2620) divulga oligorribonucleótidos no codificantes dirigidos contra el exón 70 de gen *COL7A1*, para tratar la epidermólisis ampollosa distrófica.

Sumario

5 El presente texto describe un método para restaurar la función de un colágeno de tipo VII mutado, que comprende la etapa de evitar el corte y empalme de uno o más exones que codifican la secuencia de aminoácidos del colágeno de tipo VII implicado en la disfunción de un colágeno de tipo VII mutado donde dichos exones se seleccionan del grupo que consiste en el exón 73, 74 u 80 del gen *COL7A1*.

10 El presente texto también describe un oligonucleótido no codificante complementario a una secuencia de ácido nucleico del gen *COL7A1* que es necesario para el corte y empalme correcto de uno o más exones que codifican la secuencia de aminoácidos del colágeno de tipo VII implicado en la disfunción de un colágeno de tipo VII mutado donde dichos exones se seleccionan del grupo que consiste en el exón 73, 74 u 80 del gen *COL7A1*.

15 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN complementario a una secuencia de ácido nucleico del gen *COL7A1* que es necesario para el corte y empalme correcto de uno o más exones que codifican la secuencia de aminoácidos del colágeno de tipo VII implicado en la disfunción de un colágeno de tipo VII mutado, donde dichos exones son el exón 80 del gen *COL7A1* y donde el oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

20 La presente invención también se refiere a un vector que comprende un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con la invención.

25 También se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La invención se refiere además a un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN, un vector o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en un método para el tratamiento de un paciente que padece epidermólisis ampollosa distrófica.

35 Finalmente, la invención se refiere a un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con la invención para su uso en un método para restaurar la función de un colágeno de tipo VII mutado, que comprende la etapa de evitar el corte y empalme de uno o más exones que codifican la secuencia de aminoácidos del colágeno de tipo VII implicado en la disfunción de un colágeno de tipo VII mutado donde dichos exones son el exón 80 del gen *COL7A1*.

40 También se describe un método para el tratamiento de un paciente que padece epidermólisis ampollosa distrófica causada por una disfunción de un colágeno de tipo VII mutado, que comprende la etapa de administración a dicho paciente al menos un oligonucleótido no codificante.

Descripción detallada

45 Los autores de la invención formularon la hipótesis de que la estrategia de salto de exones podría usarse para el tratamiento de la epidermólisis ampollosa distrófica y consideraron el exón 73, 74 u 80 como dianas preferentes para dicho tratamiento. Los exones 73, 74 y 80 son, de hecho, de particular interés porque portan muchas mutaciones recesivas o dominantes recurrentes en *COL7A1*. Además, estos exones codifican múltiples repeticiones colagenosas Gly-X-X, de modo que el acortamiento de la secuencia de la proteína resultante del salto de exones conservaría la periodicidad de los restos colagenosos.

Definiciones

Durante toda la memoria descriptiva, se emplean varios términos y se definen en los siguientes párrafos.

55 La expresión "disfunción de la proteína" se refiere a una pérdida de función de una proteína que induce un fenotipo anómalo.

La expresión "oligonucleótido no codificante" se refiere a una única hebra de ADN o ARN que es complementaria a una secuencia elegida.

60 La expresión "colágeno de tipo VII" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una proteína codificada por el gen *COL7A1*. La fibrilla de colágeno de tipo VII, compuesta de tres cadenas de colágeno alfa idénticas, está restringida a la zona basal por debajo del epitelio escamoso estratificado. Funciona como una fibrilla de anclaje entre el epitelio externo y el estroma subyacente. Las mutaciones en este gen están asociadas con todas las formas de epidermólisis ampollosa distrófica. La expresión puede incluir "colágeno de tipo VII" de origen natural y variantes y formas modificadas del mismo. El colágeno de tipo VII puede ser de cualquier fuente, pero típicamente es colágeno

de tipo VII de mamífero (por ejemplo, humano y de primate no humano), particularmente un colágeno de tipo VII humano.

5 Una secuencia de nucleótidos humana nativa ejemplar que codifica colágeno de tipo VII se proporciona en la base de datos GenBank con el número de acceso EMBL L23982.

En el contexto de la invención, el término "paciente" se refiere a cualquier sujeto, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano, afectado con epidermólisis ampollosa distrófica.

10 En el sentido más amplio, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso de o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

15 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según lo apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo sólido, semisólido o líquido no tóxico.

20 **Estrategia de salto de exones**

Como se entenderá por los expertos en la materia, en el núcleo celular, los genes eucariotas se transcriben en pre-ARN mensajero (pre-ARNm) que contiene tanto exones como intrones. Para formar el ARNm maduro, se produce corte y empalme en secuencias específicas en los límites de los exones y los intrones (sitios de corte y empalme) eliminando de ese modo los intrones y conectando los exones entre sí para formar el ARNm, que se traduce en proteína. Los exones pueden abordarse específicamente para evitar su inclusión en el ARNm usando oligonucleótidos no codificantes que tienen secuencias que son específicamente complementarias a secuencias dentro o en los límites de un exón diana, por ejemplo, complementario a secuencias clave de corte y empalme tales como sitios donadores de corte y empalme, sitios aceptadores de corte y empalme, puntos de ramificación, potenciadores de corte y empalme exónico (ESE) o potenciadores de corte y empalme intrónico (ISE). Por hibridación a estas secuencias, se interfiere con la maquinaria de corte y empalme, por ejemplo, solapando y enmascarando las uniones de corte y empalme de intrones/exones, secuencias ESE, secuencia ISE o puntos de ramificación, modificando de ese modo las reacciones de corte y empalme de modo que los exones diana no estén incluidos en el ARNm maduro. Es decir, los exones diana se "saltan". El ARNm, por tanto, ya no contiene la información del exón o exones saltados y la proteína que codifica no contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente al exón o exones saltados. Por consiguiente, en la presente memoria descriptiva, la expresión "prevenir el corte y empalme de un (o más) exón(es)" se refiere a la inducción de una eliminación dirigida de dicho exón o exones en el ARNm maduro mediante una modificación del corte y empalme usando la estrategia de salto de exones.

40 El texto, por tanto, proporciona métodos para restaurar la función de proteínas de interés mutadas usando la tecnología de salto de exones. El método implica el bloqueo o prevención de la incorporación en el ARNm maduro de uno o más exones diana que codifican secuencias de aminoácidos que son responsables de la disfunción de la proteína. Esto se consigue exponiendo el pre-ARNm que incluye los exones que codifican la proteína con oligonucleótidos no codificantes (AON) que son complementarios a motivos de secuencia que son necesarios para el correcto corte y empalme del uno o más exones diana. Los AON se unen a secuencias requeridas complementarias en el pre-ARNm y evitan el corte y empalme normal. En su lugar, los exones diana se escinden y no se incluyen en el ARNm maduro que se traduce en proteína, y las secuencias de aminoácidos codificadas por los exones diana se pierden de la proteína traducida.

50 El presente texto describe un método para restaurar la función de un colágeno de tipo VII mutado, que comprende la etapa de evitar el corte y empalme de uno o más exones que codifican secuencias de aminoácidos que causan dicha disfunción del colágeno de tipo VII. En un caso particular, dicho método para restaurar la función de un colágeno de tipo VII mutado comprende la etapa de evitar el corte y empalme de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste en el exón 73, 74 u 80 del gen *COL7A1*.

55 Un primer aspecto de la invención se refiere a un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN complementario a una secuencia de ácido nucleico del gen *COL7A1* que es necesario para el corte y empalme correcto de uno o más exones que codifican la secuencia de aminoácidos del colágeno de tipo VII implicado en la disfunción de un colágeno de tipo VII mutado, donde dichos exones son el exón 80 del gen *COL7A1* y donde el oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

60 Uno o más exones seleccionados del grupo que consiste en el exón 73, 74 u 80 pueden eliminarse para restaurar la funcionalidad de un colágeno VII mutado. Los expertos en la materia reconocerán que la selección de exones para su eliminación como se describe en este documento habitualmente postulará sobre la previsión de un resultado beneficioso tal como restauración de la funcionalidad de la proteína.

El texto, por tanto, proporciona métodos de restauración parcial o completa de la funcionalidad del colágeno de tipo VII, por ejemplo, un colágeno de tipo VII inestable, defectuoso, disfuncional, no suficientemente funcional o no funcional.

5 Los expertos en la materia reconocerán que hay muchas maneras para determinar o medir un nivel de funcionalidad de una proteína, y para determinar un nivel de aumento o disminución de la funcionalidad, por ejemplo, en respuesta a un protocolo de tratamiento. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, medir o detectar una actividad de la proteína, etc. dichas mediciones se hacen generalmente en comparación con un patrón o muestra de control o "normal". Además, cuando la ausencia de funcionalidad de la proteína está implicada en una patología, pueden controlarse y/o medirse los síntomas de la enfermedad para detectar indirectamente la presencia o ausencia de una proteína que funcione correctamente, o para calibrar el éxito de un protocolo de tratamiento destinado a remediar la ausencia del funcionamiento de la proteína.

10 Particularmente, la funcionalidad del colágeno de tipo VII puede medirse *in vitro* y/o *in vivo* por varios métodos reconocidos en la técnica:

- 15 - La síntesis del colágeno de tipo VII después del salto de exones puede evaluarse por transferencia de Western (Titeux *et al.*, 2010). Sin embargo, debido al pequeño tamaño de los exones diana, el ARNm saltado sintetiza una proteína con un peso molecular aparente similar al de la proteína de tipo silvestre (figura 1A).
- 20 - El ensamblaje correcto de las cadenas de colágeno $\alpha 1$ en homotrimeros puede demostrarse por transferencia Western en condiciones no reductoras. El patrón proteolítico correcto de los homotrimeros de colágeno de tipo VII puede evaluarse por digestión con pepsina y colagenasa seguida por transferencia de Western (Titeux *et al.*, 2010).
- 25 - Ensayo de migración de oro coloidal. La movilidad celular de las células tratadas puede ensayarse en una matriz de colágeno ya que las células RDEB presentan una motilidad potenciada en comparación con queratinocitos y fibroblastos normales (Chen *et al.*, 2002).
- 30 - Ensayos de adhesión *in vitro*. Las células RDEB presentan un defecto en la adhesión a los componentes de la matriz extracelular como colágeno de tipo I, colágeno de tipo IV, fibronectina, pero no laminina I (Chen *et al.*, 2002).
- 35 - La detección de colágeno de tipo VII en la unión dermoepidérmica por inmunohistoquímica indirecta usando xenoinjerto de equivalentes de piel de RDEB tratados injertados en ratones desnudos (Titeux *et al.*, 2010).
- Evaluación de formación de fibrillas de anclaje *in vivo* por microscopía electrónica de transmisión (TEM) usando xenoinjerto de equivalentes de piel de RDEB tratados injertados en ratones desnudos (Titeux *et al.*, 2010).
- 40 - Demostración de la restauración de la adherencia dermoepidérmica *in vivo* usando xenoinjerto de equivalentes de piel de RDEB tratados injertados en ratones desnudos (Titeux *et al.*, 2010).

En el presente caso, se usan AON para causar el salto de exones provocando una mejora de los síntomas de epidermolísis ampollosa distrófica (es decir, restauración de la función o estabilidad de la proteína) en el intervalo de un 30 a un 100%, en comparación con un caso de paciente no tratado. Dichos síntomas pueden observarse a nivel microscópico (es decir, restauración de la expresión y/o localización de la proteína evaluada por inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, análisis de transferencia de Western; mejora de la lesión de la piel por examen histológico; restauración/mejora de la funcionalidad de la proteína evaluada por la capacidad de formar fibrillas de anclaje entre el epitelio externo y el estroma subyacente, etc.).

50 Generalmente, la eliminación de las secuencias codificadas por exones de una proteína de colágeno de tipo VII se realiza usando oligonucleótidos no codificantes (AON). Los oligonucleótidos se diseñan para complementar secuencias adecuadas, habitualmente secuencias de ARN dentro de la molécula de pre-ARNm que son necesarias para el correcto corte y empalme del exón o exones diana, bloqueando de ese modo las reacciones de corte y empalme que incorporarían el exón o exones diana en el ARNm maduro. Un AON típicamente se une a la secuencia que complementa e impide la reacción de corte y empalme. Las secuencias se seleccionan para que sean específicas, es decir, los AON son complementarios únicamente a las secuencias del pre-ARNm y no a otras secuencias de ácido nucleico. Los AON pueden ser de cualquier tipo adecuado, por ejemplo, oligodesoxirribonucleótidos, oligorribonucleótidos, morfolidos, oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN, AON mediados por U7 o U1 o productos conjugados de los mismos tales como AON conjugados con péptido o en complejo con nanopartículas. Los AON generalmente son de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, y pueden ser de, por ejemplo, aproximadamente 10 o menos, o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 30 nucleótidos o más de longitud dependiendo de las secuencias diana y la química de AON.

65

El texto se refiere además a un oligonucleótido no codificante complementario a una secuencia de ácido nucleico del gen *COL7A1* que es necesaria para el correcto corte y empalme de uno o más exones que codifican la secuencia de aminoácidos de colágeno de tipo VII implicados en la disfunción de un colágeno de tipo VII mutado.

5 El texto se refiere a un oligonucleótido no codificante, donde dicho oligonucleótido no codificante es complementario a una secuencia de ácido nucleico que comprende o que consiste en el exón 73, 74 u 80 del gen *COL7A1*.

10 La presente invención se refiere a un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN complementario a una secuencia de ácido nucleico del gen *COL7A1* que es necesario para el corte y empalme correcto de uno o más exones que codifican la secuencia de aminoácidos del colágeno de tipo VII implicado en la disfunción de un colágeno de tipo VII mutado, donde dichos exones son el exón 80 del gen *COL7A1* y donde el oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

15 Los oligonucleótidos no codificantes se representan en la tabla 1:

Nombre	Secuencia (5'-3')
ESE73.3	UCUCCACGGUCGCCCUUCAGCCCGGUUCU (SEQ ID NO: 1)
ESE73.7	UCUCCACGGUCGCCCUUCAGCCCGC (SEQ ID NO: 2)
SA+ESE-74	CCUUUCUCUCCCGUUCUCCUGAA (SEQ ID NO: 3)
SA+ESE-74_R2063W	CCUUUCUCUCCCAUUCUCCUGAA (SEQ ID NO: 4)
ESE-74.2+SD	CCACCUGUUCUCCACGUUCUCCUUUC (SEQ ID NO: 5)
ESE-80.3	GGCCUCUUGGACCCUGCAGACCCU (SEQ ID NO: 6)
ESE80-3_Q2170X	GGCCUCUUGGACCCUACAGACCCU (SEQ ID NO: 7)

Tabla 1. Secuencias de los oligorribonucleótidos no codificantes

20 Los oligonucleótidos no codificantes ESE73.3 y ESE73.7 son particularmente adecuados para evitar el corte y empalme del exón 73 (figura 2).

SA+ESE-74, SA+ESE-74_R2063W son particularmente adecuados para evitar el corte y empalme del exón 74 (figura 2).

25 ESE-80.3 y ESE80-3_Q2170X son particularmente adecuados para evitar el corte y empalme del exón 80 (figura 2).

El oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

30 Para su uso en la presente invención, los AON de la invención pueden sintetizarse *de novo* usando cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el método de b-cianoetil fosforamidita; el método de nucleósido H-fosfonato. Estas químicas pueden realizarse por una diversidad de sintetizadores automatizados de ácido nucleído disponibles en el mercado. Estos ácidos nucleicos pueden mencionarse como ácidos nucleicos sintéticos.

35 Para su uso *in vivo*, los AON pueden estar o están estabilizados. La estabilización del AON puede conseguirse mediante modificaciones de la estructura de fosfato. Los AON estabilizados preferidos de la presente invención tienen una estructura modificada, por ejemplo, tienen enlaces fosforotioato para proporcionar actividad máxima y proteger el AON de la degradación por exo- y endonucleasas intracelulares. Otras modificaciones estabilizantes posibles incluyen modificaciones fosfodiéster, combinaciones de modificaciones fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi y combinaciones de las mismas. Las versiones modificadas químicamente estabilizadas de los AON también incluyen "morfolinos" (oligómeros de fosfordiamidato morfolino, PMO), 2'-O-Met oligómeros, triciclo (tc)-ADN, ARN nucleares cortos (sn) U7 o moléculas oligo no codificantes de triciclo-ADN (solicitud de patente provisional de Estados Unidos con n.º de serie 61/212,384 para: Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides, Compositions and Methods for the Treatment of Disease, presentada el 10 de abril de 45 2009). Otras formas de AON que pueden usarse a este efecto son secuencias AON acopladas a moléculas de ARN nuclear pequeñas tales como U1 o U7 en combinación con un método de transferencia vírica basado en, aunque sin limitación, lentivirus o virus adenoasociado.

50 Los oligonucleótidos no codificantes pueden ser nucleótidos de 2'-O-metil-fosforotioato.

Los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención pueden suministrarse *in vivo* en solitario o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo que pueda facilitar la transferencia de la secuencia no codificante a las células y preferiblemente células que expresan colágeno VII. 55 Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con degradación reducida respecto al grado de degradación que se produciría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, aunque sin limitación, plásmidos, fagómidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se

han manipulado por la inserción o incorporación de las secuencias de oligonucleótido no codificante. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, aunque sin limitación, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: lentivirus tal como VIH-1, retrovirus, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney, adenovirus, virus adenoasociado; virus de tipo SV40; virus de herpes tales como virus HSV-1 y virus vaccinia. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados, pero conocidos en la técnica. Entre los vectores que se han validado para aplicaciones clínicas y que pueden usarse para suministrar las secuencias no codificantes, los lentivirus, retrovirus y AAV muestran un mayor potencial para la estrategia de salto de exones.

Los vectores basados en retrovirus y basados en lentivirus que son defectuosos en la replicación (es decir, pueden dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero no pueden fabricar una partícula infecciosa) se han aprobado para ensayos de tratamiento génico en seres humanos. Tienen la propiedad de integrarse en el genoma celular diana, permitiendo de ese modo una expresión transgénica persistente en las células diana y su descendencia.

El parvovirus humano virus adenoasociado (AAV) es un dependovirus que es defectuoso de forma natural para la replicación, que puede integrarse en el genoma de la célula infectada para establecer una infección latente. La última propiedad parece ser única entre los virus de mamífero porque la integración se produce en un sitio específico en el genoma humano, llamado AAVS1, localizado en el cromosoma 19 (19q13.3-qter). Los vectores recombinantes basados en AAV carecen de la proteína Rep, los vectores AAV y se integran con baja eficacia y baja especificidad en el genoma hospedador, y están presentes principalmente como episomas circulares estables que pueden persistir durante meses e incluso años en las células diana. Por lo tanto, AAV ha generado un interés considerable como vector potencial para tratamiento génico en seres humanos. Entre las propiedades favorables del virus están su ausencia de asociación con cualquier enfermedad humana y la amplia gama de líneas celulares derivadas de diferentes tejidos que pueden infectarse. Actualmente se conocen 12 diferentes serotipos de AAV (AAV1 a 12), cada uno con diferentes tropismos tisulares. (Wu *et al.*, 2006). No obstante, los AAV son vectores muy valiosos que ahora se usan ampliamente para transferir pequeñas secuencias no codificantes para inactivar selectivamente alelos o modular el corte y empalme de genes diana (Goyenvalle *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004).

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han usado como vacunas de ADN para suministrar genes codificantes de antígeno a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen las mismas preocupaciones de seguridad que con muchos de los vectores víricos. Los plásmidos pueden suministrarse por una diversidad de vías parenterales, a la mucosa y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vía intradérmica, subcutánea u otra vía. También puede administrarse en la epidermis o una superficie mucosa usando una pistola génica. Los plásmidos pueden administrarse en una solución acuosa, secados sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de suministro de ADN incluyendo, aunque sin limitación liposomas, dendrímeros, cocleato y microencapsulación.

En una realización preferida, las secuencias no codificantes vectorizadas se fusionan con un pequeño ARN nuclear (ARNsn) tal como U7 o U1 para asegurar su estabilidad y dirección al empalmosoma (Goyenvalle *et al.*, 2004; Montgomery y Dietz, 1997).

Métodos de tratamiento y composiciones farmacéuticas

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con la invención, para su uso en un método para el tratamiento de pacientes que padecen DEE.

De acuerdo con la presente invención, puede eliminarse uno o más exones seleccionados del grupo que consiste en el exón 80, para restaurar la funcionalidad de un colágeno VII mutado. Los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de acuerdo con la invención son aquellos seleccionados de las secuencias SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 y pueden estar asociados con un vector como se describe anteriormente.

Un paciente como se describe en este documento puede albergar una mutación en el exón 73 y/o 74 y/u 80 del gen *COL7A1*. Dicha mutación da lugar a una disfunción de colágeno de tipo VII en dicho paciente.

La invención se refiere además a un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprende el mismo) para el tratamiento de epidermolísis ampollosa distrófica.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene al menos un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprende el mismo) para el tratamiento de epidermolísis ampollosa distrófica.

Además de los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN (o un vector que comprende los mismos), las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable tal como solución salina, fosfato de sodio, etc. Las composiciones generalmente estarán en forma de un líquido, aunque esta necesidad no es siempre el caso. Los vehículos como excipientes y diluyentes

5 adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfatos de calcio, alginato, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe acuoso, metilcelulosa, metil y propilhidroxibenzoatos, aceite mineral, etc. Las formulaciones también pueden incluir agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, conservantes, agentes tamponantes, etc. En particular, la presente invención implica la administración de oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN (o vectores que comprenden los mismos) y, por tanto, es algo parecida a tratamiento génico. Los expertos en la materia reconocerán que los ácidos nucleicos a menudo se suministran junto con lípidos (por ejemplo, lípidos catiónicos o lípidos neutros, o mezclas de estos), frecuentemente en forma de liposomas u otro material micro- o nanoestructurado adecuado (por ejemplo, micelas, lipocomplejos, dendrímeros, emulsiones, fases cúbicas, etc.).

10 Las composiciones de la invención se administran generalmente por inyección, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. Sin embargo, puede preferirse la administración tópica de la composición.

15 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol.

20 En una realización particular, puede ser deseable administrar los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprenda los mismos) en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable tópico. El vehículo farmacéuticamente aceptable tópico es cualquier vehículo sustancialmente no tóxico convencionalmente útil para administración tópica de agentes farmacéuticos en que los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprenda los mismos) permanecerán estables y biodisponibles cuando se aplique directamente a superficies de la piel. Por ejemplo, vehículos tales como los conocidos en la técnica eficaces para penetrar en la capa de queratina de la piel en el estrato córneo pueden ser útiles en el suministro de los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprenda los mismos) al área de interés. Dichos vehículos incluyen liposomas. Los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprende los mismos) pueden dispersarse o emulsionarse en un medio de una manera convencional para formar una preparación líquida o mezclarse con un vehículo semisólido (gel) o sólido para formar una pasta, polvo, pomada, crema, loción o similares.

30 Los vehículos farmacéuticamente aceptables tópicos adecuados incluyen agua, solución salina tamponada, gelatina de petróleo (vaselina), petrolato, aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal, ceras orgánicas e inorgánicas, tales como cera microcristalina, de parafina y de ozocerita, polímeros naturales, tales como xantanos, gelatina, celulosa, colágeno, almidón o goma arábica, polímeros sintéticos, alcoholes, polioles y similares. El vehículo puede ser una composición de vehículo miscible en agua. Dicha composición de vehículo farmacéuticamente aceptable tópico miscible en agua puede incluir las preparadas con uno o más ingredientes apropiados al principio del tratamiento.

40 Como las afecciones dermatológicas a tratar pueden ser visibles, el vehículo tópico también puede ser un vehículo aceptable tópico. El vehículo aceptable tópico será cualquier vehículo sustancialmente no tóxico convencionalmente útil para administración tópica en que los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención permanecerán estables y biodisponibles cuando se aplique directamente a la superficie de la piel. Los vehículos cosméticamente aceptables adecuados son conocidos para los expertos en la materia e incluyen, aunque sin limitación, líquidos, cremas, aceites, lociones, pomadas, geles o sólidos cosméticamente aceptables, tales como cremas de noche cosméticas convencionales, cremas de base, lociones bronceadoras, protectores solares, lociones para manos, maquillaje y bases de maquillaje, máscaras y similares. Los vehículos aceptables tópicos pueden ser de naturaleza similar o idéntica a los vehículos farmacéuticamente aceptables tópicos descritos anteriormente.

50 Puede ser deseable tener un sistema de suministro que controle la liberación de oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención a la piel y se adhiera o se mantenga por sí mismo sobre la piel durante un periodo prolongado de tiempo para aumentar el tiempo de contacto de los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprende los mismos) sobre la piel. La liberación sostenida o retardada de oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprende los mismos) proporciona una administración más eficaz dando como resultado una dosificación menos frecuente y/o disminuida de oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprende los mismos) y mejor cumplimiento del paciente. Los ejemplos de vehículos adecuados para liberación sostenida o retardada en un entorno húmedo incluyen gelatina, goma arábica, polímeros de xantano. Los vehículos farmacéuticos con capacidad de liberación de los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención, cuando se exponen a cualquier entorno oleoso, graso, ceroso o húmedo en el área que se está tratando, incluyen resina termoplástica o termoestable flexible o elastómero incluyendo resinas termoplásticas tales como poli(haluros de vinilo), poli(ésteres de vinilo), poli(haluros de vinilideno) y poliolefinas halogenadas, elastómeros tales como látex, polidienos y cauchos naturales y sintéticos halogenados, y resinas termoestables flexibles tales como poliuretanos, resinas epoxi y similares. Los sistemas de suministro controlado se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5427778 que proporciona formulaciones de gel y soluciones viscosas para el suministro de los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprende los mismos) a un sitio de la piel. Los geles tienen las ventajas de tener un alto contenido de agua para mantener la humedad de la piel, la capacidad de

absorber exudado de la piel, fácil aplicación y fácil eliminación por lavado. Preferiblemente, el vehículo de liberación sostenida o retardada es un gel, liposoma, microesponja o microesfera. Los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención (o un vector que comprende los mismos) también pueden administrarse en combinación con otros agentes farmacéuticamente eficaces incluyendo, aunque sin limitación antibióticos, otros agentes de curación de la piel y antioxidantes.

Un experto en la materia reconocerá que la cantidad de un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN (o un vector que comprende el mismo) a administrar será una cantidad que sea suficiente para inducir la mejora de los síntomas de enfermedad indeseados. Dicha cantidad puede variar entre otras cosas dependiendo de factores tales como el género, la edad, el peso, el estado físico global del paciente, etc. y puede determinarse en una base de caso por caso. La cantidad también puede variar de acuerdo con el tipo de afección que se esté tratando, y los otros componentes de un protocolo de tratamiento (por ejemplo, administración de otros medicamentos tales como esteroides, etc.). Generalmente, una dosis adecuada está en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. Si se elige un suministro basado en virus de oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN, las dosis adecuadas dependerán de diferentes factores tales como la cepa vírica que se emplea, la vía de suministro (intramuscular, intravenosa, intraarterial u otra), pero típicamente puede variar de $10e10$ a $10e12$ partículas víricas/kg. Los expertos en la materia reconocerán que dichos parámetros se calculan normalmente durante ensayos clínicos. Además, los expertos en la materia reconocerán que, aunque los síntomas de la enfermedad pueden aliviarse completamente por los tratamientos descritos en este documento, este no tiene que ser necesariamente el caso. Incluso un alivio parcial o intermitente de los síntomas puede ser de gran beneficio para el destinatario. Además, el tratamiento del paciente habitualmente no es un único evento. En su lugar, los oligonucleótidos no codificantes de triciclo-ADN de la invención probablemente se administrarán en múltiples ocasiones, que pueden estar, dependiendo de los resultados obtenidos, separadas en varios días, separadas en varias semanas o separadas en varios meses, o incluso separadas en varios años.

La invención se ilustrará adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras

Figura 1. Demostración de la funcionalidad del colágeno de tipo VII con el exón 73 u 80 eliminado. A) Colágeno de tipo VII de tipo silvestre o formas eliminadas que carecen del exón 73 u 80 analizadas en un gel de gradiente de un 4-12% en condiciones no reductoras (NR) o después de reducción con β -mercaptoetanol (R), que muestra la presencia tanto de monómeros (M, 300 kDa) como de homotrímeros (H, ~900 kDa) de colágeno de tipo VII. B) Xenoinjertos de equivalentes de piel humana (SE) analizados por inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión que muestran el depósito de colágeno de tipo VII normal a lo largo de la unión dermoepidérmica; formación de fibrillas de anclaje (puntas de flecha rojas) y adhesión dermoepidérmica en SE hecho de células normales (NHK/NHF) y células que expresan formas eliminadas (K Δ 73/F Δ 73 y K Δ 80/F Δ 80) pero no en SE hecho de células RDEB no modificadas (Krdeb/Fdreb). Obsérvese la formación de ampollas característica (flecha).

Figura 2. Demostración de la eficacia del salto de exones *in vitro*. Experimentos de respuesta a dosis de 3 oligorribonucleótidos no codificantes dirigidos al exón 73, exón 74 o exón 80 de *COL7A1* (véase la tabla 1). Se realizaron RT-PCR sobre ARN total extraído 48 h después de transfección de 20 a 200 nM de los oligorribonucleótidos de 2'O-metil fosforotioato sobre queratinocitos y fibroblastos humanos normales (A) y sobre queratinocitos y fibroblastos RDEB (B). La mutación en el ARN mensajero diana se indica en rojo. Se indican los amplímeros de tipo silvestre y saltados. La densitometría en gel demostró una eficacia de salto que varía de 40 a un 90% dependiendo del exón diana y la cantidad del no codificante.

Figura 3. Clonación de un ADNc de colágeno de tipo VII con la secuencia del exón 73 eliminada en una estructura de vector retrovírico de MSCV. Se usó la misma estrategia para generar el vector MSCV-COL7A1 Δ 80.

Figura 4. Demostración *in vitro* de la reexpresión de colágeno de tipo VII después del salto de exones en fibroblastos RDEB. Se trataron fibroblastos primarios RDEB de un paciente que portaba una mutación sin sentido homocigótica (p.Gln2170Term) con AON ESE80.3 para inducir salto del exón 80 en fase. A) El análisis de RT-PCR demostró un alto nivel de salto de exones (~85%) en fibroblastos RDEB transfectados (RDEB-T) en comparación con células no tratadas (RDEB). B) El análisis de transferencia de Western demostró una fuerte expresión de colágeno de tipo VII en células tratadas (RDEB-T) en comparación con fibroblastos no transfectados (RDEB). La expresión en células RDEB-T se estimó en hasta un 20% de la cantidad normal en comparación con extractos proteínicos de fibroblastos humanos normales.

Figura 5. Demostración *in vitro* de la reexpresión de colágeno de tipo VII después de salto exones en queratinocitos RDEB. Los queratinocitos primarios RDEB de un paciente con base heterocigótica para mutaciones de desplazamiento de fase en el exón 73 y en el exón 80 se trataron con AON ESE 73.3 y AON ESE80.3 para inducir el salto de exones en fase de los exones 73 y 80, respectivamente. A) El análisis de RT-PCR demostró un alto nivel de salto de exones en que queratinocitos RDEB transfectados (RDEB-T) en comparación con células no

tratadas (RDEB). B) El análisis de transferencia de Western demostró una fuerte expresión de colágeno de tipo VII en células tratadas (RDEB-T) en comparación con queratinocitos no transfectados (RDEB).

Ejemplo 1: Demostración de la funcionalidad de moléculas de colágeno de tipo VII con secuencias de los exones diana eliminadas.

I-1. Clonación de ADNc de COL7A1 eliminados en vectores retrovíricos.

Para demostrar que el salto de uno de estos exones conserva la función de la proteína, se clonaron diferentes ADNc de colágeno de tipo VII eliminados en un vector retrovírico (figura 3). Se clonó un fragmento SacII BglIII que abarcaba los exones 58 a 94 en un vector PGEM-T (Promega) generando el plásmido PGEM-COL7A1-SacII/BglIII. Se diseñaron dos cebadores (1 y 2) para amplificar un fragmento que contenía los exones 58 a 72. Se diseñaron otros dos cebadores (3 y 4) para amplificar un fragmento que contenía el sitio de restricción Hpy99I al final del exón 72 hasta el exón 94, pero perdiendo la secuencia del exón 73. La línea roja representa la secuencia del exón 72 contenida en el cebador 3. Después de la amplificación por PCR usando polimerasa con corrección de errores Pfx (Invitrogen), los fragmentos se subclonaron en vectores PGEM-T, se digirieron usando SacII, BglIII y Hpy99I y después se clonaron en el PGEM-COL7A1-SacII/BglIII generando un fragmento SacII/BglIII con la secuencia del exón 73 eliminada. Este fragmento se clonó posteriormente en un vector MSCV-COL7A1 digerido por SacII/BglIII para generar el vector retrovírico MSCV-COL7A1Δ73. Se usó la misma estrategia para generar un vector retrovírico MSCV-COL7A1Δ80. Los vectores retrovíricos MSCV-COL7A1-Δ74 y MSCV-COL7A1Δ73-74 están actualmente en construcción.

I-2. Producción de partículas retrovíricas y transducción de queratinocitos RDEB.

Se produjeron vectores retrovíricos seudotipados anfótrofos que expresan el ADNc de *COL7A1* de tipo silvestre o ADNc con los exones 73 u 80 eliminados por tritransfección transitoria en células HEK 293T de una construcción de empaquetado que codifica las funciones auxiliares, un plásmido que produce la envuelta anfótropa y los propios vectores (Zufferey *et al.*, 1997). Se recogió el medio de cultivo a las 24, 48 y 72 horas, se combinó, se filtró en 0,45 μm, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su uso. Los títulos víricos se determinaron por periodo de transducción de 2 horas con diluciones en serie de las preparaciones de vector de 10⁵ células HCT116 en una placa de doce pocillos en presencia de 6 μg/ml de polibreno. Unas 72 h después, se extrajo el ADN genómico de las células transducidas usando un kit de purificación de ADN genómico (Promega). Se determinó el título de partículas infecciosas (ip/ml) por PCR en tiempo real cuantitativa usando cebadores y sondas específicas para los provirus integrados.

Se sembraron en placa queratinocitos RDEB a una densidad de 10 000 células por cm² en placas de cultivo de seis pocillos. Las células se infectaron con suspensiones víricas a una MOI de 20 con polibreno (8 μg/ml). Se cambió el medio 4 horas después y las células se cultivaron en su medio de cultivo. La eficacia de transducción se evaluó por inmunocitoquímica. Se ha conseguido un buen nivel de transducción (aproximadamente un 80%) con cada vector retrovírico.

I-3. Síntesis de colágeno de tipo VII eliminado y ensamblaje

El sobrenadante de cultivo de queratinocitos RDEB primarios transducidos con cada vector retrovírico que expresa ADNc de *COL7A1* de tipo silvestre, ADNc de *COL7A1Δ73* y *COL7A1Δ80* se sometió a SDS-PAGE y se inmunotransfirió usando anticuerpo LH 7.2 (figura 1A). En condiciones no reductoras, se detectaron bandas de 900 kDa correspondientes a homotrimeros de colágeno de tipo VII de longitud completa y colágeno de tipo VII eliminado. En condiciones reductoras, se observaron únicamente bandas correspondientes a monómeros de colágeno de tipo VII de longitud completa y colágeno de tipo VII eliminado. Como las dos proteínas difieren únicamente en 67 aminoácidos, presentan el mismo peso molecular aparente. Este resultado demuestra que el colágeno de tipo VII con el exón 73 o el exón 80 eliminado se secreta y puede homotrimerizar.

I-4. Evaluación de la funcionalidad in vivo y formación de fibrillas de anclaje

La siguiente etapa es demostrar que los homotrimeros de colágeno de tipo VII eliminado pueden ensamblarse en fibrillas de anclaje apropiadas. Para este fin, se están usando equivalentes de piel hechos de queratinocitos humanos y fibroblastos humanos injertados en ratones SCID. Los equivalentes de piel humana injertados en ratones inmunodeficientes constituyen una herramienta poderosa para evaluar las propiedades funcionales de las formas corregidas de moléculas de colágeno de tipo VII *in vivo*. Los equivalentes de piel injertados pueden mantenerse en los ratones hospedadores durante varios meses, permitiendo que el colágeno de tipo VII humano se acumule y organice en fibrillas de anclaje detectables por microscopía electrónica de transmisión (Titeux *et al.* 2010).

Los equivalentes de piel se han generado usando queratinocitos humanos primarios normales (que expresan *COL7A1* de tipo silvestre), queratinocitos RDEB primarios (que carecen de expresión de *COL7A1*) y queratinocitos RDEB primarios modificados por ingeniería genética (que expresan *COL7A1Δ73* o *COL7A1Δ80*) como componente epidérmico. En cada caso, el componente dérmico se hace con fibroblastos primarios RDEB que carecen de

expresión de colágeno de tipo VII. Después, se injertan de forma ortotópica en el lomo de ratones inmunodeficientes. Los equivalentes de piel hechos de queratinocitos RDEB y queratinocitos humanos normales sirven como control negativo y positivo respectivamente (figura 1B).

- 5 Estos resultados demuestran claramente que el colágeno de tipo VII con las secuencias codificadas por el exón 73 y 80 eliminadas es funcional *in vivo*.

Ejemplo 2: Demostración del salto eficaz de los exones seleccionados de COL7A1 *in vitro*.

- 10 Una vez demostrado que COL7A1 con las secuencias codificadas por los exones diana eliminados es funcional, se ha inducido la eliminación dirigida de estos exones usando AON.

Se han seleccionado más de 16 secuencias no codificantes diferentes dirigidas a elementos de corte y empalme clave en los exones seleccionados e intrones adyacentes: sitios de corte y empalme donadores/aceptadores, puntos de ramificación ESE, predichos *in silico* por los programas informáticos ESE-finder o RESCUE-ESE (Cartegni *et al.*, 2003; Fairbrother *et al.*, 2002).

Los AON usados eran ribonucleótidos modificados con 2'O-metil-fosforotioato. La longitud y ΔG de autohibridación o dimerización fueron factores importantes que afectaban a la eficacia de los AON. Las secuencias de AON de mejores resultados se enumeran en la tabla 1.

Estos AON se transfectaron usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en queratinocitos normales y RDEB primarios cultivados y fibroblastos a dosis crecientes que varían de 50 nM hasta 200 nM. Los resultados muestran que la eficacia del salto de exones varía entre un 50 hasta un 95% en células primarias de paciente como se demuestra por densitometría después experimentos de RT-PCR (figura 2).

Ejemplo 3: Demostración de la corrección funcional *in vitro* después de salto de exones

La demostración *in vitro* de la restauración de la funcionalidad del colágeno de tipo VII después del salto de exones puede realizarse por análisis de transferencia de Western. Los fibroblastos de un paciente que porta una mutación sin sentido homocigótica en el exón 80 (p.Gln2170Term) se han transfectado con el 2'O-metil oligorribonucleótido ESE80.3 (50 nM). Se extrajo el ARN total y la proteína total 72 h después. El ARN se sometió a RT-PCR para demostrar el salto en fase y las proteínas se sometieron a SDS-PAGE y transferencia de Western (figura 4). Se demostró una alta eficacia de salto de exones (~85%) por RT-PCR y densitometría en gel (figura 4A). El análisis de transferencia de Western reveló una fuerte reexpresión de colágeno de tipo VII en las células RDEB después de 72 h de tratamiento con el AON (RDEB-T) en comparación con fibroblastos RDEB no transfectados (RDEB). La expresión de colágeno de tipo VII se estimó en un 20% de la cantidad en fibroblastos humanos normales (NHF) después únicamente 3 días de tratamiento.

Asimismo, se trataron queratinocitos de un paciente con base heterocigótica para mutaciones de desplazamiento de fase en los exones 73 (p.Gln2014ArgfsX83) y 80 (p.Gly2177TrpfsX112) con 50 nM de ESE 73.3 o 50 nM de ESE 80.3 para inducir el salto en fase de los exones 73 y 80 (figura 5). El análisis de transferencia de Western demostró una fuerte reexpresión de la proteína colágeno de tipo VII (figura 5B), más fuerte en las células tratadas con ESE 73.3 de acuerdo con la eficacia de salto de exones demostrada por RT-PCR (figura 5A).

Referencias

Durante toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- 50 Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q., y Krainer, A.R. (2003). ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31, 3568-3571.

Chen, M., Kasahara, N., Keene, D.R., Chan, L., Hoeffler, W.K., Finlay, D., Barcova, M., Cannon, P.M., Mazurek, C., y Woodley, D.T. (2002). Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 32, 670-675.

Fairbrother, W.G., Yeh, R.F., Sharp, P.A., y Burge, C.B. (2002). Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297, 1007-1013.

- 60 Fine, J.D., Eady, R.A., Bauer, E.A., Briggaman, R.A., Bruckner-Tuderman, L., Christiano, A., Heagerty, A., Hintner, H., Jonkman, M.F., McGrath, J., *et al.* (2000). Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the Second International Consensus Meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol* 42, 1051-1066.

- 65 Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.C., Garcia, L., y Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796-1799.

5 Hilal, L., Rochat, A., Duquesnoy, P., Blanchet-Bardon, C., Wechsler, J., Martin, N., Christiano, A.M., Barrandon, Y., Uitto, J., Goossens, M., *et al.* (1993). A homozygous insertion-deletion in the type VII collagen gene (COL7A1) in Hallopeau-Siemens dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 5, 287-293.

10 Hovnanian, A., Duquesnoy, P., Blanchet-Bardon, C., Knowlton, R.G., Amselem, S., Lathrop, M., Dubertret, L., Uitto, J., y Goossens, M. (1992). Genetic linkage of recessive dystrophic epidermolysis bullosa to the type VII collagen gene. *J Clin Invest* 90, 1032-1036.

15 Montgomery, R.A., y Dietz, H.C. (1997). Inhibition of fibrillin 1 expression using U1 snRNA as a vehicle for the presentation of antisense targeting sequence. *Hum Mol Genet* 6, 519-525.

Titeux, M., Pendaries, V., Zanta-Boussif, M.A., Decha, A., Pironon, N., Tonasso, L., Mejia, J.E., Brice, A., Danos, O., y Hovnanian, A. (2010). SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther* 18, 1509-1518.

20 Varki, R., Sadowski, S., Uitto, J., y Pfenninger, E. (2007). Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J Med Genet* 44, 181-192.

25 Wu, Z., Asokan, A., y Samulski, R.J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14, 316-327.

Xia, H., Mao, Q., Eliason, S.L., Harper, S.Q., Martins, I.H., Orr, H.T., Paulson, H.L., Yang, L., Kotin, R.M., y Davidson, B.L. (2004). RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10, 816-820.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., y Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-875.

30 **LISTA DE SECUENCIAS**

35 <110> INSERM (INSTITUTO NACIONAL DE LA SALUD E INVESTIGACIÓN MÉDICA)
UNIVERSIDAD DE PARIS DESCARTES
ASOCIACIÓN FRANCESA CONTRA LAS MIOPATÍAS (AFM)
ASISTENCIA PÚBLICA-HOSPITALES DE PARÍS (APHP)

<120> TRATAMIENTO DE SALTO DE EXONES PARA EPIDERMÓLISIS AMPOLLOSA DISTRÓFICA

40 <130> PR78777

<160> 7

<170> BiSSAP 1.3.6

45 <210> 1
<211> 30
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> ESE73.3

<400> 1
ucuccacggu cgcccuucag cccgcguucu

30

55 <210> 2
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> ESE73.7

	<400> 2 ucuccacggu cgcccuucag cccgc	25
5	<210> 3 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> SA+ESE-74	
	<400> 3 ccuuucucuc cccguucucc cugaa	25
15	<210> 4 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> SA+ESE-74_R2063W	
25	<400> 4 ccuuucucuc cccauucucc cugaa	25
30	<210> 5 <211> 26 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> ESE-74.2+SD	
35	<400> 5 ccaccuguuc uccacguucu ccuuuc	26
40	<210> 6 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> ESE-80.3	
45	<400> 6 ggccucuugg acccugcaga cccu	24
50	<210> 7 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> ESE80-3_Q2170X	
55	<400> 7 ggccucuugg acccuacaga cccu	24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN complementario a una secuencia de ácido nucleico del gen *COL7A1* que es necesario para un correcto corte y empalme de uno o más exones que codifican una secuencia de aminoácidos de colágeno de tipo VII implicado en disfunción de un colágeno de tipo VII mutado, en el que dichos exones son el exón 80 del gen *COL7A1* y en el que el oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.
- 10 2. El oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho exón es adicionalmente exón 74 del gen *COL7A1*.
- 15 3. El oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho exón es adicionalmente exón 73 del gen *COL7A1*.
- 20 4. Un vector que comprende un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con la reivindicación 1 a 3.
5. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Un oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método para el tratamiento de un paciente que padece epidermólisis ampollosa distrófica.
7. El oligonucleótido no codificante de triciclo-ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método para restaurar la función de un colágeno de tipo VII mutado, que comprende la etapa de evitar el corte y empalme de uno o más exones que codifican la secuencia de aminoácidos del colágeno de tipo VII implicado en la disfunción de un colágeno de tipo VII mutado donde dichos exones son el exón 80 del gen *COL7A1*.
- 30 8. Un vector de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en un método para el tratamiento de un paciente que padece epidermólisis ampollosa distrófica.
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en un método para el tratamiento de un paciente que padece epidermólisis ampollosa distrófica.
- 35 10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha composición farmacéutica se administra por inyección o por vía tópica.

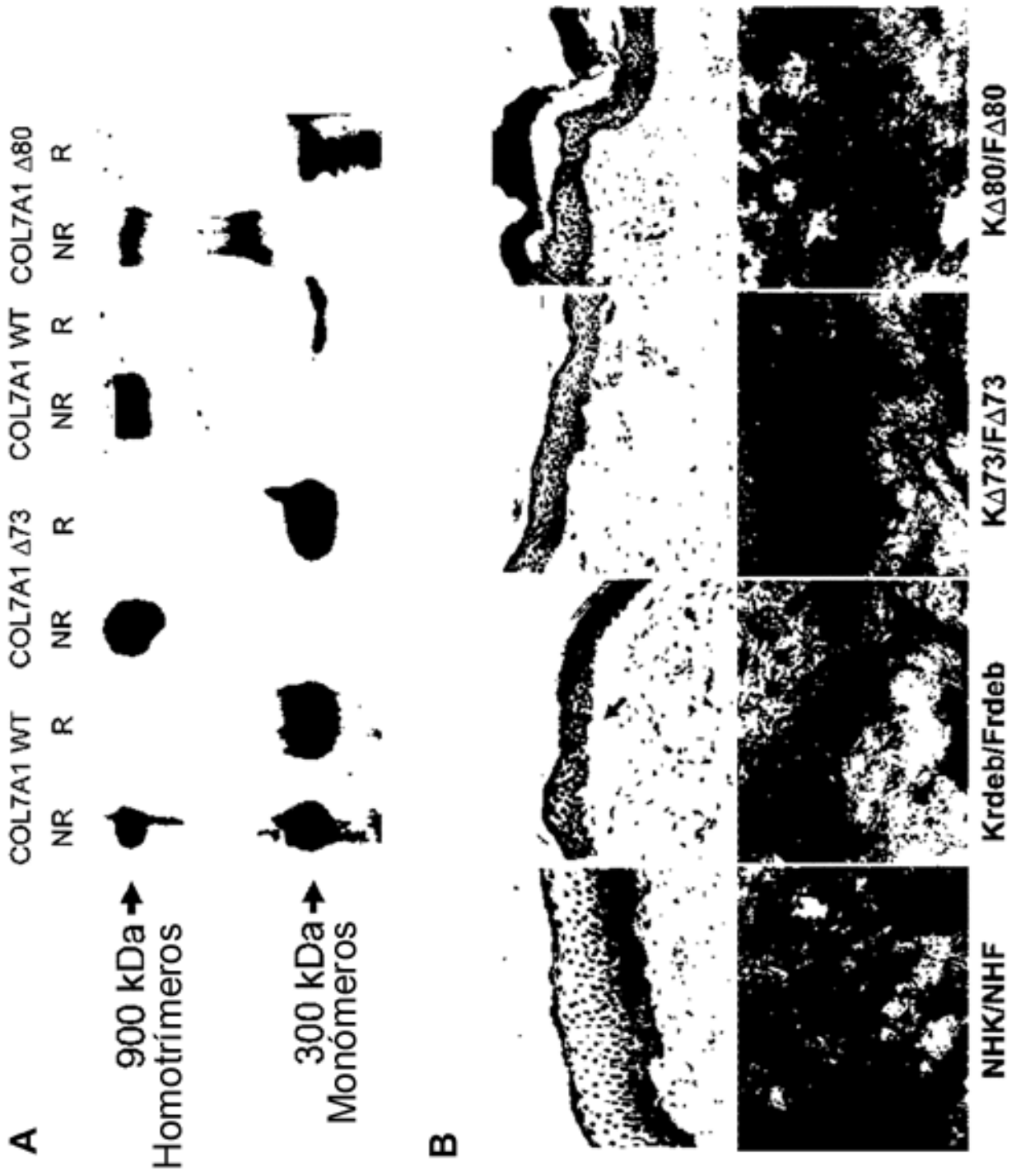


Figura 1

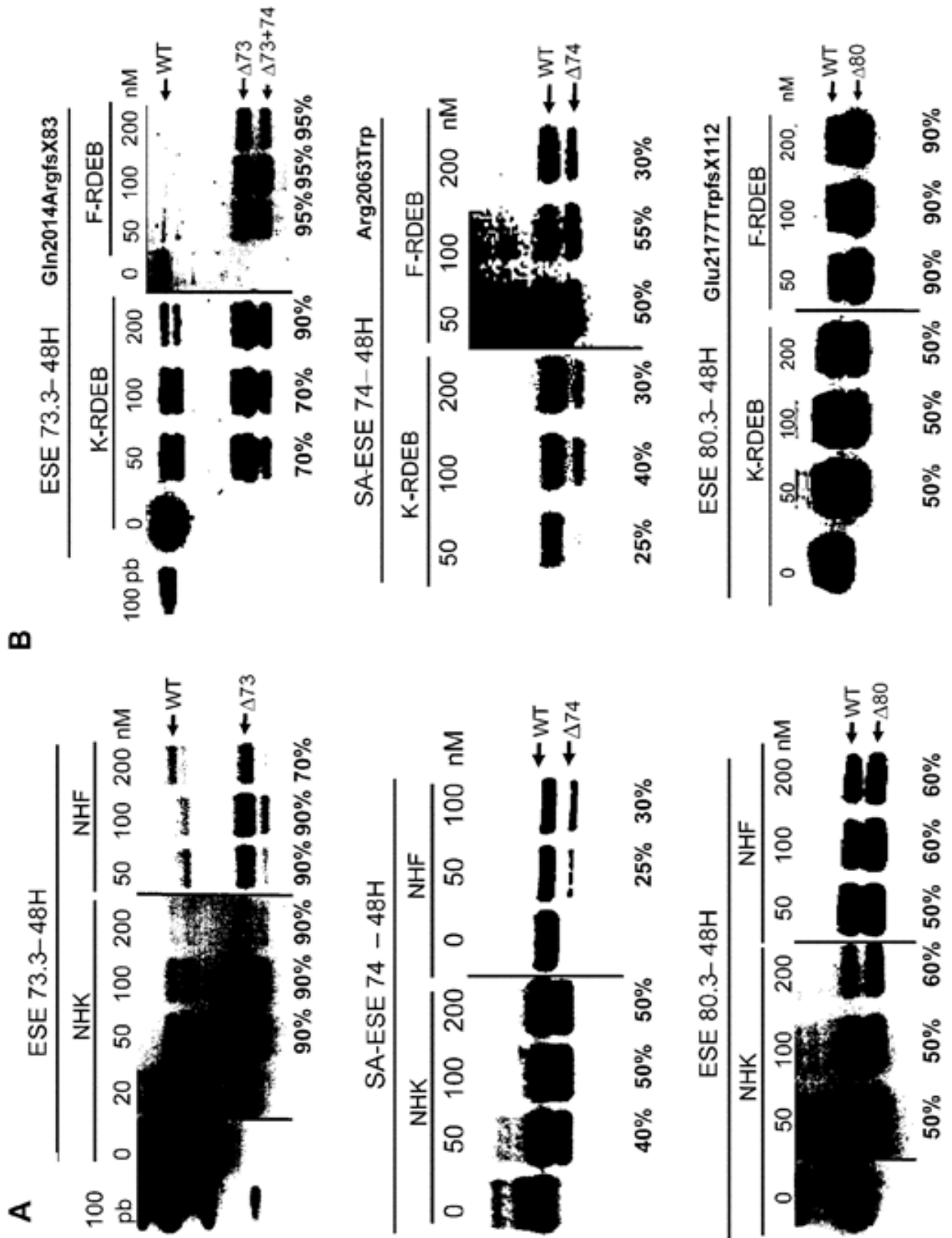


Figura 2

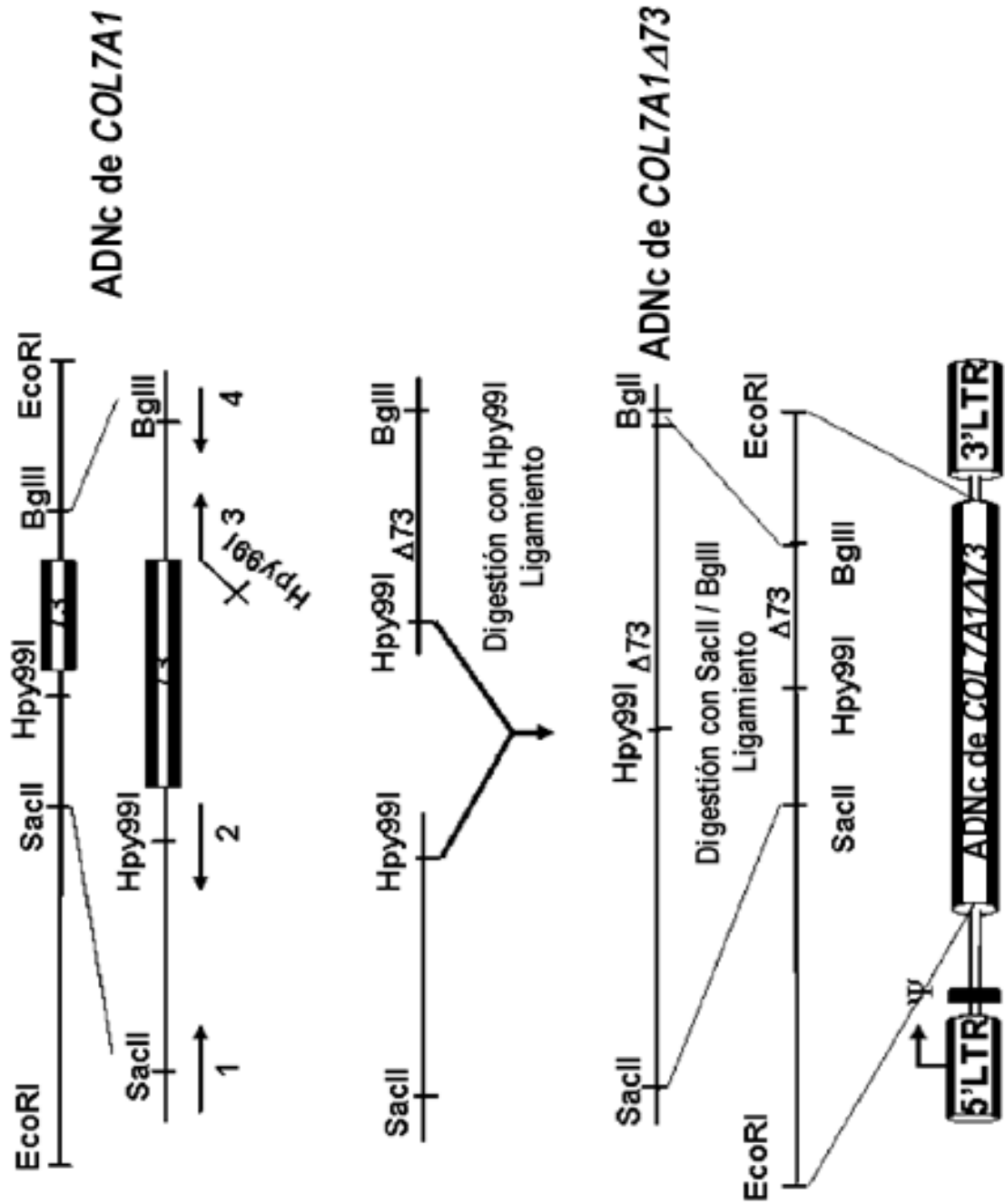


Figura 3

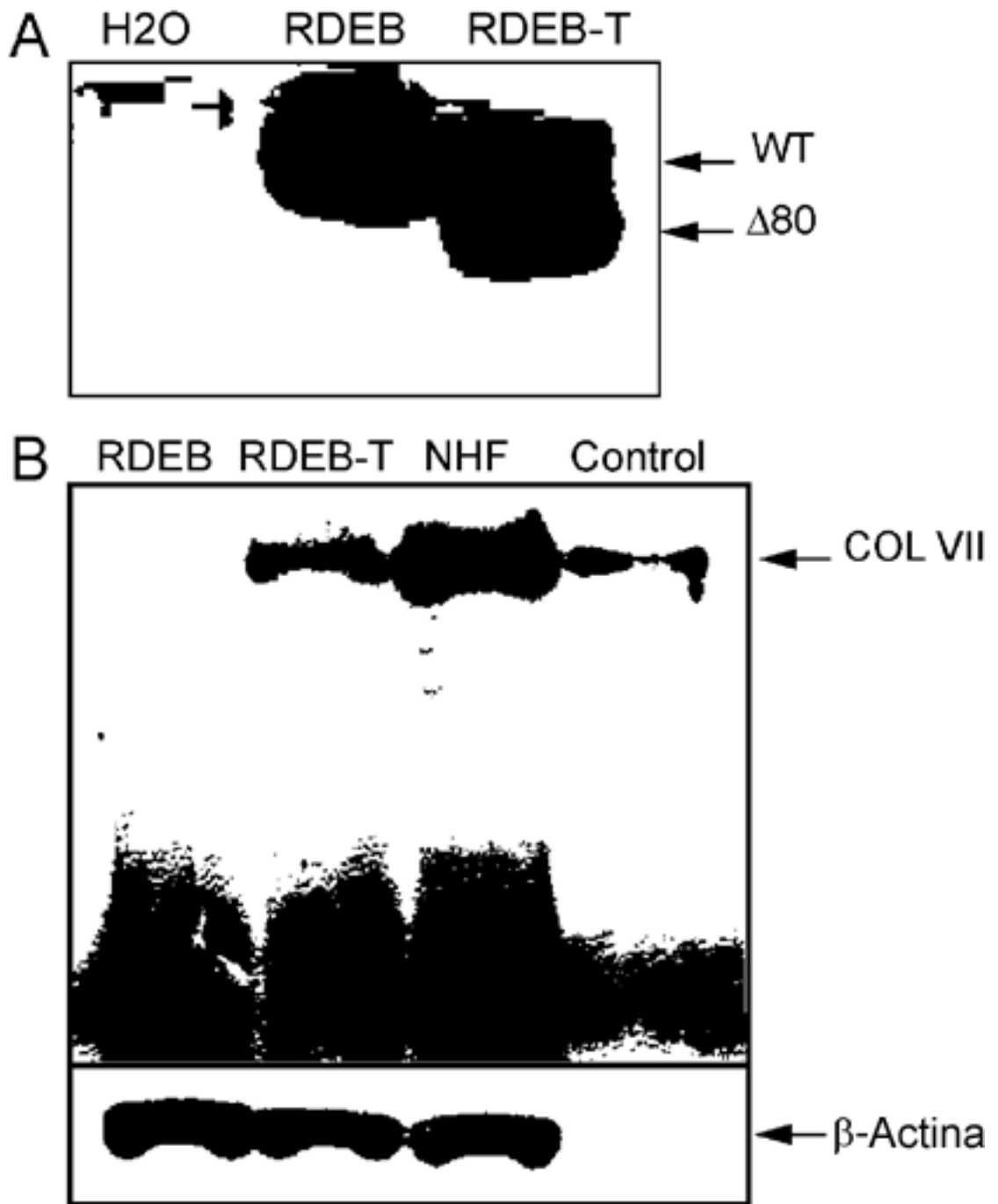


Figura 4

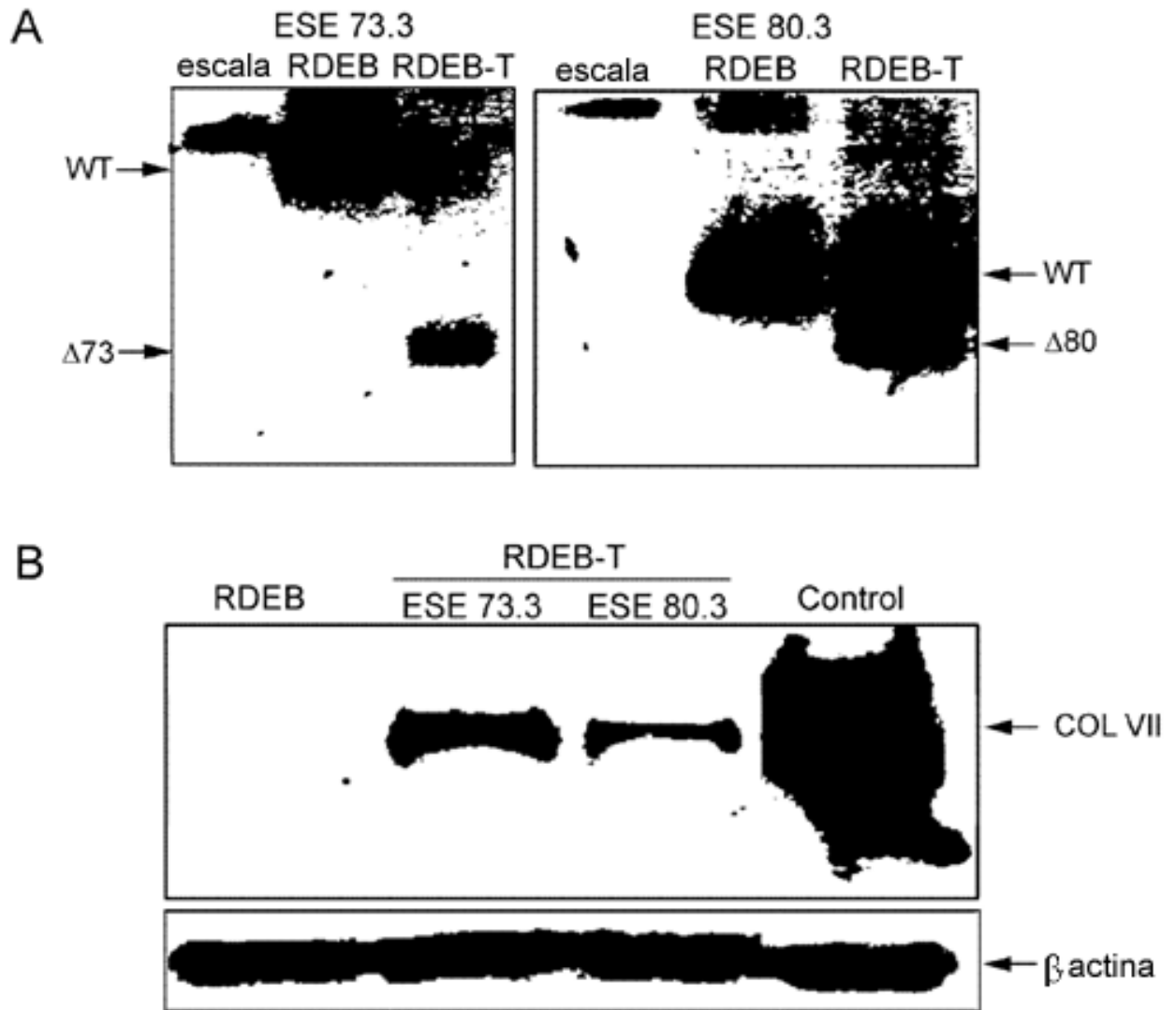


Figura 5