

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901881312A1

Publication Date

20120415

Applicant

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA

Title

MOLECOLA DI U1SNRNA UMANO MODIFICATO, GENE CODIFICANTE PER
LA MOLECOLA DI U1SNRNA UMANO MODIFICATO, VETTORE DI
ESPRESSIONE INCLUDENTE IL GENE, E LORO USO IN TERAPIA
GENICA

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
"Molecola di UlsnRNA umano modificato, gene codificante per la molecola di UlsnRNA umano modificato, vettore di espressione includente il gene, e loro uso in terapia genica"

Di: Università degli Studi di Ferrara, nazionalità italiana, via Savonarola 9, 44100 Ferrara (Italia; I.C.G.E.B. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, nazionalità italiana, Area Science Park, Padriciano 99, 34149 Trieste (Italia)
Inventori designati: PAGANI, Franco; PINOTTI, Mirko
Depositata il: 15 Ottobre 2010

* * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda molecole di snRNA umano modificate atte ad essere impiegate in procedimenti di terapia genica. In particolare l'invenzione riguarda molecole di snRNA capaci di correggere processi di *splicing* aberranti causati da mutazioni geniche ed correlati con patologie umane con quadri clinici diversi, sovente di intensa gravità.

Numerose patologie genetiche umane (15% circa) sono determinate da mutazioni geniche che, interferendo sulla corretta maturazione intracellulare

dell'RNA messaggero, compromettono l'accurato svolgimento della successiva biosintesi proteica ed inducono la sintesi di proteine non funzionali. Per la maggior parte, le mutazioni puntiformi all'origine dei difetti di splicing riguardano sequenze geniche critiche per il riconoscimento del trascritto primario da parte del macchinario deputato al suo processamento. Tra le sequenze di maggiore rilevanza vi sono i siti donatore ed accettore posizionati al confine tra esoni ed introni nonché elementi regolatori gene-specifici con localizzazione esonica o intronica (1, 5). Come conseguenza di queste mutazioni, possono essere indotti eventi molecolari diversi, che più frequentemente riguardano l'esclusione di un esone dal trascritto maturo, il cosiddetto salto dell'esone o *exon skipping*, o l'attivazione di un sito criptico di *splicing*.

Da tempo è noto che alterazioni molecolari del processamento dell'RNA messaggero che comportano ad esempio lo *skipping* di esoni, ossia il "salto" di esoni, rappresentano il meccanismo eziopatogenetico principale di varie patologie umane, fra cui l'emofilia B, la fibrosi cistica e l'atrofia musco-

lare spinale, che sono accomunate dalla gravità dei loro decorsi clinici.

Il difetto del fattore IX (FIX) della coagulazione è alla base dell'insorgenza dell'emofilia B, malattia associata a manifestazioni emorragiche di entità variabile, talvolta molto gravi ed invalidanti. Ad esempio, mutazioni in posizione -2 nel sito donatore dell'esone 5 del gene del fattore IX (F9) determinano l'esclusione dell'esone 5 dall'mRNA durante il processo di *splicing* e rappresentano la causa di forme severe di malattia.

Le limitazioni dell'attuale terapia dell'emofilia B, che è fondamentalmente basata sulla frequente infusione di FIX esogeno ricombinante o derivato da direttamente da plasma, sottolineano la necessità di sviluppare approcci alternativi caratterizzati da una maggiore efficacia ed effetto duraturo.

La fibrosi cistica (FC) è la malattia ereditaria congenita ad esito letale più frequente nella popolazione caucasica: ne è affetto un neonato ogni 2500-2700 nati vivi.

La patogenesi di questa malattia è secondaria ad un'anomalia della proteina chiamata CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) loca-

lizzata nella membrana apicale delle cellule degli epiteli e avente la funzione di regolare gli scambi idroelettrolitici.

Come conseguenza dell'alterazione di CFTR, il trasporto dei sali attraverso le membrane cellulari viene compromesso determinando principalmente una produzione di secrezioni che potrebbero essere definite "disidratate": un sudore molto ricco in sodio e cloro ed un muco denso e vischioso che tende ad ostruire i dotti compromettendo la funzione di vari organi ed apparati. Nel corso di diversi studi, sono state identificate numerose alterazioni della sequenza del gene CFTR associate alla fibrosi cistica e, tra queste, le mutazioni localizzate nel sito di *splicing* dell'esone 12 provocano l'esclusione di questa porzione genica codificante dal trascritto e sono frequentemente associate a quadri clinici di intensa gravità.

L'atrofia muscolare spinale (SMA, OMIM 253300, 253550, e 253400) è una malattia neuromuscolare autosomica recessiva caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni alfa del midollo spinale con una prevalenza stimata di 1/10.000 nati. La SMA è associata a sindromi cliniche che variano da molto severe con grave ipotonìa muscolare e debolezza fin

dalla nascita, a forme più lievi in cui l'esordio si verifica più tardivamente durante l'infanzia o l'adolescenza. Sino ad oggi non è ancora stato individuato un trattamento per questa patologia che in genere conduce a morte ad un'età che dipende dalla severità del quadro clinico.

Nel 95 % dei casi la malattia è causata dall'assenza del gene SMN1. Nel genoma umano esiste un gene omologo ad SMN1 chiamato SMN2. L'espressione di SMN2 è tuttavia compromessa da una mutazione sinonima che determina una maturazione aberrante dell'RNA messaggero con conseguente salto dell'esone 7 ed inattivazione del gene stesso. Approcci in grado di incrementare il numero di trascritti SMN2 contenenti l'esone 7 consentirebbero pertanto di applicare una terapia di compensazione per la mancanza del gene SMN1 grazie all'espressione corretta di SMN2, con notevoli implicazioni per un potenziale trattamento efficace della SMA.

Nell'ambito del processo di *splicing* i piccoli RNA nucleari (snRNA) giocano un ruolo primario quali componenti fondamentali dello spliceosoma, il macchinario cellulare deputato a mediare l'intero processo di maturazione dell'mRNA. In particolare,

il piccolo RNA U1 (U1snRNA), lungo 164 ribonucleotidi, è codificato da geni presenti in più copie nel genoma umano e rappresenta la componente ribonucleica della particella nucleare U1snRNP. Le molecole di U1snRNA hanno una struttura tridimensionale ad ansa e forcina (*stem* e *loop*) ed includono nella regione 5' una sequenza a singolo filamento, lunga in genere 9 nucleotidi, atta a legare per complementarità il sito donatore dello *splicing* sulla molecola di pre-mRNA (Horowitz et al., 1994). La figura 1 mostra una rappresentazione schematica della struttura dell'U1snRNA *wild-type*. La sequenza nella regione 5' atta al riconoscimento del sito donatore dello *splicing* è mostrata appaiata alla sequenza *consensus* del sito donatore dello *splicing* nei trascritti primari dei geni eucariotici. Tale sequenza presenta gradi diversi di conservazione ed è situata in corrispondenza della giunzione esone/introne. Il riconoscimento mediato dalla regione 5' del U1snRNA è cruciale per la definizione delle giunzioni esone-introne sul trascritto primario e per l'assemblaggio corretto del complesso dello spliceosoma.

Il crescente numero di patologie genetiche umane associate a difetti di *splicing* del pre-mRNA e

la frequente gravità del loro decorso clinico hanno stimolato negli ultimi anni la ricerca di molecole terapeutiche mirate alla correzione dei difetti di *splicing* a livello molecolare.

In Pinotti M et al. 2008 e Pinotti M et al., 2009 (9, 10) è descritto l'impiego di molecole di UlsnRNA modificate capaci di ripristinare *in vitro* lo *splicing* corretto dell'mRNA del fattore VII di coagulazione. Poiché il meccanismo illustrato si basa sul riconoscimento e il legame da parte dell'UlsnRNA modificato con i siti di giunzione esone/introne mutati e pertanto con sequenze aventi un alto grado di conservazione genomica, esso presenta lo svantaggio di non avere un'assoluta specificità dell'azione della molecola di snRNA terapeutica verso il gene bersaglio, con il rischio di interferire con la maturazione di trascritti originati da altri geni *wild-type* funzionali.

La presente invenzione ha dunque lo scopo di mettere a disposizione molecole di UlsnRNA modificate capaci di ripristinare il corretto *splicing* di pre-mRNA trascritti da geni recanti mutazioni che determinano uno *splicing* aberrante, con un grado di efficacia pari a quello descritto nella tecnica anteriore, ma caratterizzate al tempo stesso da una

maggiore selettività di azione sul trascritto del gene bersaglio di interesse terapeutico.

Questi e altri scopi sono raggiunti con una molecola di U1snRNA umano modificato, caratterizzata dal fatto che una porzione della sequenza nucleotidica a singolo filamento della regione 5' del U1snRNA umano *wild-type* è sostituita con una sequenza nucleotidica legante a singolo filamento atta a ibridarsi con una sequenza nucleotidica bersaglio del trascritto primario di un gene bersaglio di interesse terapeutico che porta una mutazione causa di *splicing* aberrante. La sequenza nucleotidica bersaglio della molecola di U1snRNA è situata in una regione del pre-mRNA compresa fra le 50 paia di basi a monte e le 100 paia di basi a valle di un sito di giunzione esone/introne il cui *splicing* è influenzato dalla suddetta mutazione, con la condizione che la sequenza nucleotidica bersaglio non comprenda il suddetto sito di giunzione esone/introne. Preferibilmente, la sequenza nucleotidica bersaglio ha una lunghezza di 5 a 50 nucleotidi, più preferibilmente 9 a 30 nucleotidi.

Rispetto alla tecnica anteriore, le molecole di U1snRNA oggetto dell'invenzione hanno il vantaggio di svolgere un'azione mirata e selettiva, poiché

legano sequenze nucleotidiche bersaglio sul trascritto primario localizzate nelle regioni introniche o esoniche fiancheggianti il sito donatore di *splicing*, che presentano un grado di conservazione inferiore rispetto alle sequenze dei siti di giunzione esone/introne. E' tuttavia sorprendente il fatto che, pur operando su sequenze bersaglio che non includono il sito di giunzione esone/introne, le molecole di UlsnRNA dell'invenzione siano comunque in grado di influire sul meccanismo di *splicing*.

Ulteriori caratteristiche dell'invenzione sono definite nelle annesse rivendicazioni, che formano parte integrante dell'insegnamento tecnico della presente descrizione.

In una forma di realizzazione preferita, la porzione della regione 5' a singolo filamento del UlsnRNA *wild-type* che è sostituita con la sequenza nucleotidica legante ha una lunghezza di 9 a 12 nucleotidi.

Tra le mutazioni geniche che inducono il processo di *splicing* aberrante e che sono efficacemente trattate con l'UlsnRNA modificato della presente invenzione, si citano a titolo esemplificativo mutazioni atte a causare il salto dell'esone e muta-

zioni atte a creare un sito donatore criptico. Preferibilmente, le mutazioni sono localizzate in un introne, in un esone o in un sito donatore per lo *splicing*.

Tra i geni di interesse terapeutico, ossia recanti mutazioni correlate a patologie che si prestano ad essere trattate con l'UlsnRNA modificato della presente invenzione, si citano a titolo esemplificativo il gene del fattore IX della coagulazione, il gene SMN2 e il gene CFTR.

In una forma di realizzazione preferita, la molecola di UlsnRNA umano modificato dell'invenzione include una sequenza nucleotidica legante scelta dal gruppo che consiste delle sequenze SEQ ID No.: 1 a 11.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è un gene isolato codificante per la molecola di UlsnRNA umano modificato dell'invenzione.

In una forma di realizzazione preferita, il gene comprende una sequenza promotore e una sequenza segnale di poliadenilazione. Gli inventori hanno verificato che il promotore endogeno del gene codificante per UlsnRNA umano è particolarmente adatto, anche se possono essere impiegati anche altri promotori di per sé noti, che possono essere facilmen-

te selezionati dal tecnico medio del settore.

A titolo esemplificativo, qui di seguito è riportata la sequenza del filamento senso del gene codificante l'U1snRNA umano *wild-type* (designata SEQ ID NO: 12 nel *sequence listing*), nella quale è evidenziata in grassetto la porzione della regione 5' a singolo filamento che, nella molecola di U1snRNA modificato, è sostituita con la sequenza legante. Le sequenze dei siti unici di restrizione BglII e BclI, utilizzati per inserire le sequenze leganti, sono sottolineate. La sequenza genica SEQ ID NO:12 comprende, oltre alla regione codificante per l'RNA, che è indicata in lettere maiuscole, anche alcuni elementi regolatori necessari per la sua espressione, quali il promotore e il segnale di poliadenilazione.

5' -

taaggaccagcttctttgggagagaaacagacgcaggggcgggagggaaaaa
gggagaggcagacgtcacttccccttggcggctctggcagcagattggtcg
gttgagtggcagaaaggcagacggggactgggcaaggcactgtcgggtgaca
tcacggacagggcgacttctatgtagatgaggcagcgcagaggctgacgtc
ttcgccacttgctgcttcaccacgaaggagttcccgtgccctgggagcggg
ttcaggaccgctgatcggaagtgagaatcccagctgtgtgtcagggctgga
aagggctcgggagtgcgcggggcaagtgaccgtgtgtgtaaagagtgaggc
gtatgaggctgtgtcggggcagaggcccaagatctgAT**ACTTACCTG**GCAG

GGGAGATACCATTGATCACGAAGGTGGTTTTTCCCAGGGCGAGGCTTATCCAT
TGCACTCCGGATGTGCTGACCCCTGCGATTTCGCCAAATGTGGGAAACTCG
ACTGCATAATTTGTGGTAGTGGGGGACTGCGTTCGCGCTTTCCCCTGactt
tctggagtttcaaaagtagactgtacgctaa-3' (SEQ ID NO:12)

Naturalmente, la sequenza genica di cui sopra è fornita esclusivamente a titolo esemplificativo. In alternativa, per costruire il gene codificante per gli UlsnRNA modificati dell'invenzione, può essere impiegata qualsiasi sequenza genica omologa a SEQ ID NO:12, ossia avente la capacità di codificare per un UlsnRNA capace di mediare il riconoscimento del sito donatore dello *splicing* in maniera efficace.

La metodica di preparazione delle diverse molecole di UlsnRNA modificate oggetto dell'invenzione, contenenti le diverse sequenze leganti, è descritta in dettaglio nella sezione relativa agli esempi.

Ancora un altro oggetto dell'invenzione è un vettore di espressione che comprende un gene isolato come definito in precedenza. Il vettore di espressione preferito è un vettore adenovirale, anche se possono essere utilizzati anche altri tipi di vettori di espressione che sono di per sé noti al tecnico medio del settore.

Come descritto in precedenza, la molecola di UlsnRNA umano modificato, il gene codificante per

tale molecola di RNA e il vettore includente il suddetto gene sono idonei all'impiego per il trattamento terapeutico di una patologia genetica causata o associata a *splicing* aberrante. Preferibilmente, ma non a titolo limitativo, la patologia è la fibrosi cistica, l'emofilia B o l'atrofia muscolo spinale.

A tale scopo, la molecola di U1snRNA modificato, il gene e/o il vettore sono formulati in una composizione farmaceutica comprendente, oltre alle molecole terapeuticamente attive, un veicolo farmaceuticamente accettabile. La scelta del veicolo e degli eventuali eccipienti farmaceutici rientra nelle capacità del tecnico medio del settore.

Un altro aspetto dell'invenzione è un procedimento *in vitro* per ripristinare in una cellula in coltura il corretto *splicing* di un gene bersaglio di interesse terapeutico recante una mutazione inducente *splicing* aberrante mediante la transfezione della cellula in coltura con un vettore di espressione come definito in precedenza.

Le molecole di U1snRNA modificate oggetto dell'invenzione sono state prodotte impiegando metodiche di biologia molecolare tradizionali, ben note al tecnico medio del settore. Per la valuta-

zione degli effetti degli UlsnRNA oggetto dell'invenzione sulla correzione dei processi aberranti di *splicing*, gli inventori hanno impiegato la metodologia dei minigeni, la cui applicazione è ampiamente documentata nella letteratura scientifica. Tale metodica prevede il clonaggio di una porzione di un gene, recante la mutazione causa di difetti di *splicing*, in un vettore di espressione e la successiva transfezione del vettore ricombinante in cellule in coltura *in vitro*. L'analisi dei trascritti originati dalla porzione del gene di interesse viene effettuata mediante RT-PCR, consentendo pertanto l'identificazione di molecole di mRNA di lunghezza anomala derivate dai processi di *splicing* aberrante. La comparsa di trascritti di interesse di lunghezza normale in seguito alla cotrasfezione degli UlsnRNA modificati con i minigeni, ed il loro sequenziamento, rappresenta la chiara indicazione della capacità da parte delle molecole di UlsnRNA di ripristinare processi di *splicing* corretti.

Gli esempi che seguono sono forniti a scopo illustrativo e non limitativo della portata dell'invenzione come definita nelle annesse rivendicazioni.

ESEMPIO 1: Creazione degli U1 snRNA modificati

Gli U1 snRNA modificati sono stati realizzati con la seguente procedura: il plasmide contenente la sequenza del gene dell'U1-snRNA *wild-type*, ossia l'U1-snRNA non modificato, è stato digerito con gli enzimi di restrizione BglII e BclI. La sequenza compresa tra questi due siti di restrizione è stata sostituita con un oligonucleotide a doppio filamento comprendente la sequenza legante. Le sequenze diretta e inversa di ciascun oligonucleotide oligonucleotidi sono descritte nella tabella 1 sottostante ed i risultanti U1-snRNA modificati prendono il nome dagli oligonucleotidi utilizzati.

La figura 2 mostra inoltre una rappresentazione schematica degli elementi del gene per lo U1 snRNA. E' indicata la strategia di clonaggio con la quale sono stati preparati i diversi U1 snRNA modificati. La figura 2 mostra il gene dello U1snRNA con gli elementi promotori DSE E PSE, la regione codificante per lo U1 snRNA (centrale) e il box di processamento al 3', inseriti in un vettore plasmidico (pGEM). Il sito di inizio di trascrizione è indicato da una freccia. La sequenza tra i siti di restrizione BglII e BclI include la regione codificante per la coda a singolo filamento dello U1snRNA che è stata sostituita da oligonucleotidi specifici

per la creazione degli U1 snRNA modificati indicati in Tabella 1.

Tabella 1

Oligonucleotidi per U1 FIX esone 5		SEQ ID NO:
FIX U1 ex5 C3T5A6 dir	GATCTCattatgacctgGCAGGGGAGATACCAT	13
FIX U1 ex5 C3T5A6 rev	GATCATGGTATCTCCCCTGCcaggtcataatGA	14
U1FIXex5 SH-7 dir	gatctcataTGACCTGCTGGcaggggagataccat	15
U1FIXex5 SH-7 rev	gatcatggtatctcccctgcCCAGCAGGTCAtatga	16
U1FIXex5 SH1 dir	gatctcataGATTATGACGcaggggagataccat	17
U1FIXex5 SH1 rev	gatcatggtatctcccctgcGTCATAATCtatga	18
U1FIXex5 SH7 dir	GATCTCatcttattcagatGCAGGGGAGATACCAT	19
U1FIXex5 SH7 rev	GATCATGGTATCTCCCCTGCatctgaataagatGA	20
U1FIXex5 SH9 dir	GATCTCattcttattcagGCAGGGGAGATACCAT	21
U1FIXex5 SH9 rev	GATCATGGTATCTCCCCTGCctgaataagaatGA	22
U1FIXex5 SH10 dir	GATCTCatatcttattcaGCAGGGGAGATACCAT	23
U1FIXex5 SH10 rev	GATCATGGTATCTCCCCTGCTgaataagatatGA	24
U1FIXex5 SH13 dir	gatctcataAAATCTTATgcaggggagataccat	25
U1FIXex5 SH13 rev	gatcatggtatctcccctgcATAAGATTTtatga	26
U1FIXex5 SH16 dir	gatctcataTAAAAATCTgcaggggagataccat	27
U1FIXex5 SH16 rev	gatcatggtatctcccctgcAGATTTTTTAtatga	28
U1FIXex5 SH22 dir	gatctcataTTTCTTTAAAgcaggggagataccat	29
U1FIXex5 SH22 rev	gatcatggtatctcccctgcTTTAAAGAAAtatga	30
U1FIXex5 SH33 dir	GATCTCattcagatacagaGCAGGGGAGATACCAT	31
U1FIXex5 SH33 rev	GATCATGGTATCTCCCCTGCtctgtatctgaatGA	32
U1FIXex5 SH38 dir	GATCTCatagtttcagatGCAGGGGAGATACCAT	33
U1FIXex5 SH38 rev	GATCATGGTATCTCCCCTGCatctgaaactatGA	34
U1FIXex5 SH63 dir	GATCTCatttatgtaggGCAGGGGAGATACCAT	35
U1FIXex5 SH63 rev	GATCATGGTATCTCCCCTGCacctacataaatGA	36
Oligonucleotidi per U1 SMN		
U1ex7SMN -1G-2G-3A rev	GAT CAT GGT ATC TCC CCT GCG GAG TAA GTT ATG A	37
U1ex7SMN -1G-2G-3A dir	GAT CTC ATA ACT TAC TCC GCA GGG GAG ATA CCA T	38
U1ex7SMN sh2 rev	GAT CAT GGT ATC TCC CCT GCT AAG TCT GCT ATG A	39
U1ex7SMN sh2 dir	GAT CTC ATA GCA GAC TTA GCA GGG GAG ATA CCA T	40
U1ex7SMN sh17 rev	GAT CAT GGT ATC TCC CCT GCT ATG AAA GTT ATG A	41
U1ex7SMN sh17 dir	GAT CTC ATA ACT TTC ATA GCA GGG GAG ATA CCA T	42
Oligonucleotidi per U1 CFTR esone 12		
U1 -1A 4T dir	gatctcATACaTACtTGcaggggagataccat	43
U1 -1A 4T rev	gatcatggtatctcccctgcCAaGTAtGTATga	44

U1 G3 T4 dir	gatctcATACacACCTGgcaggggagataccat	45
U1 G3 T4 REV	gatcatgggatctcccctgcCAGGTgtGTATga	46
U1 T4 A5 dir	gatctcATAAtACCTGgcaggggagataccat	47
U1 T4 A5 REV	gatcatgggatctcccctgcCAGGTAtaTATga	48
U1 CF sh+1 dir	gatctcTCAAAGAACATACgcaggggagataccat	49
U1 CF sh+1 REV	gatcatgggatctcccctgcGTATGTTCTTTGAga	50
CF12 SH+9 Dir	gatctcATAGGTATTCAAAGcaggggagataccat	51
CF12 SH+9 Rev	gatcatgggatctcccctgcTTTGAATACCTATga	52
CF12 SH+11 Dir	gatctcATAAGTAAGGTATTCAGcaggggagataccat	53
CF12 SH+11 Rev	gatcatgggatctcccctgcTGAATACCTTACTTATga	54
CF12 SH+33 DIR	gatcatgggatctcccctgCTCATGCTAAAATAg	55
CF12 SH+33 REV	gatctcTATTTTAGCATGAGcaggggagataccat	56

ESEMPIO 2: Trasfezione dei minigeni in cellule in coltura ed analisi dei prodotti di *splicing*

I vettori contenenti sono stati inseriti nelle cellule mediante transfezione transiente con Lipofectamina (liposomi). In seguito all'estrazione dell'RNA cellulare totale con Trizol, l'RNA è stato analizzato mediante RT-PCR con inneschi specifici. La reazione si svolge in due fasi: la retrotrascrizione dell'RNA in un filamento di cDNA a opera di una trascrittasi inversa usando come stampi random primers e l'amplificazione del cDNA ottenuto mediante una DNA polimerasi.

La reazione di PCR è stata effettuata in un volume finale di 25 µl di una miscela contenente:

- 5 µl di AMV/Tfl 5x buffer idoneo al corretto funzionamento di entrambi gli enzimi sopra citati;
- 1 µl di dNTPs mix 10 mM;
- 50 pmol di primer forward e 50 pmol di primer re-

verse;

- 2 μ l MgSO_4 25mM;
- 2 μ l di RNA estratto dalle cellule;
- 1 μ l di AMV-RT (0,1 μ / μ l), 1 μ l di Tfl DNA polimerasi;
- H_2O ultra pura a volume.

La fase di retrotrascrizione è stata effettuata a 45°C per 45'. E' poi seguita una fase in cui la miscela di PCR è stata portata alla temperatura di 94°C per 2', a cui a cui hanno fatto seguito 40 cicli di PCR ed infine una fase di estensione per 7" a 68 °C.

I prodotti dell'amplificazione sono stati sottoposti a separazione elettroforetica in gel di agaroso e/o a corsa in elettroforesi capillare.

Esempio 3: Mutazioni esoniche vicino al sito donatore dell'esone 5 del Fattore IX della coagulazione associate ad emofilia B

Nel gene del fattore IX (F9) le mutazioni esoniche in posizione -2 nel sito donatore dell'esone 5 sono associate all'emofilia B. E' interessante notare che le mutazioni in posizione -2 nell'esone sono sinonime e non modificano la sequenza codificante ma inducono il salto dell'esone e pertanto sono classificabili come mutazioni di *splicing*.

La tabella 2 mostra le mutazioni esoniche in posizione -2 dell'esone 5 del gene del FIX identificate in pazienti affetti da emofilia B (Emofilia B International database). I nucleotidi appartenenti all'esone 5 sono mostrati in maiuscole, mentre quelli appartenenti all'introne sono in minuscolo. Ogni posizione, mostrata nella parte bassa della figura, è interessata da una o più mutazioni, il cui cambio nucleotidico è mostrato in grassetto.

Tabella 2

Posizione	Sostituzione nucleotidica	Sequenza del sito donatore <i>Posizioni: -3 -2 -1 \ +1+2+3+4+5+6</i>
-2	A>C	<u>CCG\gtcata</u>
-2	A>G	<u>CGG\gtcata</u>
-2	A>T	<u>CTG\gtcata</u>

Per lo studio dello *splicing* del FIX normale e mutato è stato costruito un vettore per espressione di un costrutto minigenico chiamato pTB NdeI FIX. Per far questo, una porzione di DNA genomica di 308 bp a monte dell'esone 5 e 283bp a valle della regione interessata dalle mutazioni è stata inserita in un vettore ampiamente utilizzato per lo studio dello *splicing in vitro*, il plasmide pTBNdeI (6-8).

Nella figura 3 è rappresentata schematicamente

la parte centrale del costrutto pTB FIX ex5 usato nello studio dello *splicing*. I rettangoli azzurro ed arancione rappresentano le regioni centrali del costrutto di α -globina e dell'esone 5 del FIX, con gli introni rappresentati come linee. L'esone 5 e le regioni introniche fiancheggianti (IVS4 and IVS5) sono state clonate nel plasmide pTB. La trascrizione è sotto il controllo del promotore dell' α -globina e dell'enhancer di SV40 enhancer. Le due possibili isoforme di *splicing* sono indicate.

In seguito all'introduzione delle mutazioni gli inventori ne hanno successivamente dimostrato l'effetto causativo mediante l'espressione dei minigeni creati in cellule eucariotiche HepG2, il modello cellulare ideale per studiare proteine di origine epatica, come il FIX. In particolare i vettori sono stati inseriti nelle cellule mediante transfezione transiente ed l'RNA analizzato come indicato nell'allegato metodi utilizzando come inneschi gli oligonucleotidi alfa2-3 e BRA2. Nello specifico, tutte le mutazioni in posizione -2 inducono la completa esclusione dell'esone. Nella figura 4 è rappresentata l'analisi del mutante -2C. Simili risultati sono stati ottenuti con gli altri due mutanti in posizione -2.

In Tabella 3 è riportata la lista delle U1-snRNA modificate create, la loro sequenza bersaglio e la loro localizzazione intorno al sito donatore. Sulla mutazione in posizione -2C sono state testate le diverse U1-snRNA modificate ed il loro effetto sulla percentuale di inclusione dell'esone 5 è mostrato nella figura 4.

Tabella 3: Sequenze leganti degli U1-snRNA modificati per la correzione dei difetti di *splicing* dell'esone 5 del gene del fattore IX

FIX U1-snRNAs	Sequenza legante (5'→3')	Sequenza bersaglio (5'→3')	Lunghezza (bp)	SEQ ID NO:
C3T5A6	uau <u>g</u> accug	caggtcata	9	57
FIX_SH-7	ugaccugcugg	ccagcaggtca	11	58
FIX_SH1	agauuau <u>g</u> ac	gtcataatct	9	1
FIX_SH7	ucuuauucaga	tctgaataaga	13	2
FIX_SH9	ucuuauuca	tgaataaga	9	3
FIX_SH10	aucuuauuc	gaataagat	9	4
FIX_SH13	aaaau <u>cu</u> ua	taagatttt	9	5
FIX_SH16	uaaaaaa <u>uc</u>	gatttttta	9	6
FIX_SH22	uuucuuuaa	ttaaagaaa	9	7

Nella figura 5 è mostrata la localizzazione degli U1 snRNA modificati utilizzati per la correzione dei difetti di *splicing* dell'esone 5 del gene del fattore di coagulazione IX. Il rettangolo indica l'esone 5, la sequenza rimanente indica l'introne.

La figura 4 mostra chiaramente che numerosi U1snRNA modificati sono in grado di aumentare in

modo significativo la percentuale di inclusione dell'esone 5, compensando così gli effetti della mutazione in posizione -2C. Ciò indica che il legame di U1-snRNA al sito donatore (U1-C3T5A6, corsa 3) o vicino ad esso (U1-SHIFT) favorisce la definizione dell'esone 5. L'efficienza dipende dalla posizione e le U1-SH1, SH9, SH10, mostrano una attività maggiore. L'efficienza diminuisce all'aumentare della distanza dal sito di *splicing* canonico. E' importante notare che la complementarità degli U1 snRNA su sequenze introniche non conservate fiancheggianti il sito di *splicing* è importante per aumentarne la specificità. Occorre inoltre sottolineare che anche piccoli aumenti di FIX (>2% del normale) risulterebbero in un significativo miglioramento della tendenza emorragica nei pazienti. Per questa ragione anche le molecole U1-snRNA modificate meno efficienti possono avere significato terapeutico nell'emofilia B, così come in altri difetti della coagulazione. Effetti analoghi con gli le molecole U1snRNA modificate sono stati ottenuti con le altre due mutazioni in posizione -2, la -2A>G e al -2A>T.

Esempio 4: Mutazione intronica vicino al sito donatore dell'esone 5 del Fattore IX della coagulazione

associate ad emofilia B

Nel gene del fattore IX (F9) la mutazioni intronica in posizione 13 al 5' del sito donatore dell'esone 5 è associata alla malattia. Questa mutazione testata nel minigene pTB induce la attivazione di un sito criptico 13 paia di basi dopo il sito canonico. L'approccio di correzione mediato dalle U1-snRNA modificate è stato anche applicato alla mutazione +13A>G che causa l'attivazione di un sito criptico in posizione +13 (figura 6). Come si può osservare in figura 6, la coespressione della variante +13A>G con uno dei più attivi U1snRNA modificati SH9 analizzato nell'esempio 3, è in grado di ripristinare parzialmente l'utilizzo del sito corretto e quindi il normale processamento del messaggero.

La Tabella 4 sottostante mostra la localizzazione della mutazione +13 A>G nell'introne 5 del F9 identificata in pazienti con emofilia B (database internazionale Emofilia B). I nucleotidi appartenenti all'esone 5 sono mostrati in maiuscole, mentre quelli appartenenti all'introne sono in minuscolo. Il nucleotide mutato è indicato in grassetto.

Tabella 4

Posizione	Sostituzione nucleotidica	Sequenza	SEQ ID NO:
+13	A>G	<u>CAG\gtcataatctgagtaaga</u>	59

La figura 6 mostra i risultati dell'analisi mediante elettroforesi capillare delle isoforme di *splicing* derivanti dalla trasfezione del minigene FIX ex5 con la mutazione +13A>G da solo o associato allo U1 modificato U1Sh9. La trasfezione del costrutto +13G mostra la comparsa di un banda che corrisponde alla attivazione di un sito 5'ss criptico. La costrafezione con U1 Sh9 induce un aumento significativo nella percentuale di inclusione dell'esone normale. A destra i grafici rappresentano le percentuali delle diverse isoforme calcolate dai rispettivi tracciati elettroforetici indicati a sinistra. I pozzetti 1, 2 e 3 corrispondono alle percentuali di inclusione delle bande con salto dell'esone, inclusione dell'esone e sito 5'ss criptico, rispettivamente.

Esempio 5: Atrofia Muscolare Spinale

Per lo studio sono stati utilizzati i vettori esprimanti i minigeni di SMN1 (pCI-SMN1) e SMN2 (pCI-SMN2) (2). Tali minigeni sono ampiamente utilizzati per validare l'effetto di molecole terapeutiche.

tiche in grado di correggere il difetto di *splicing* nel gene SMN2 (2, 3).

I due minigeni sono costituiti da 111 nucleotidi dell'esone 6, 200 nucleotidi dell'introne 6, i 54 nucleotidi dell'esone 7, i 444 nucleotidi dell'introne 7 e i primi 75 nucleotidi dell'esone 8 sotto il controllo del promotore CMV. I due minigeni differiscono per la presenza di una sostituzione nucleotidica nell'esone 7 in posizione 6. Nel pCI-SMN1 è presente una C mentre nel pCI-SMN2 è presente una T. Questa sostituzione sinonima induce nel pCI-SMN2 un difetto di *splicing* con salto dell'esone 7 dal trascritto maturo. Nella figura 7 viene rappresentato schematicamente il minigene pCI-SMN2. La variante sinonima all'interno dell'esone in posizione +6T che induce salto dell'esone è indicata.

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che la correzione dello *splicing* del gene SMN2 rappresenta una valida strategia terapeutica nella SMA (2-4). La Tabella 5 riporta la lista delle U1-snRNA modificate create, la loro sequenza bersaglio e la loro localizzazione intorno al sito donatore. Le diverse U1-snRNA modificate ed il loro effetto sulla percentuale di inclusione dell'esone 7 sono sta-

te testate nel minigene SMN2 e come controllo sul minigene SMN1.

Tabella 5: Sequenze di riconoscimento (U1-SR) nel gene per le U1-snRNA modificate per la correzione del difetto di *splicing* dell'esone 7 del gene SMN2

SMN U1-snRNAs	Sequenza legante (5'→3')	Sequenza bersaglio (5'→3')	Lunghezza (bp)	SEQ ID NO:
-1G-2G-3A	acuuacucc	ggagtaagt	9	60
SMN_SH2	gcagacuua	taagtctgc	9	8
SMN_SH17	acuucaua	tatgaaagt	9	9

La figura 8 mostra la localizzazione degli SMN U1 snRNA modificati utilizzati per la correzione del difetto di *splicing* del gene SMN2.

I minigeni sono stati introdotti in cellule HeLa mediante transfezione transiente con Lipofectamina (liposomi). L'RNA è stato analizzato RT-PCR come indicato nell'esempio 2: L'RNA estratto dalla cellule è stato successivamente sottoposto ad RT-PCR con i primers pCIFwdB e E8-75 R al fine di valutare i prodotti di *splicing*.

Come si può osservare in figura 9, la trasfezione del plasmide pCI SMN2 in cellule in coltura mostra prevalentemente salto dell'esone 7. La cotrasfezione con il plasmide di controllo U1-Wt (pozzetto 2) non ha nessun effetto. La cotrasfezione del plasmidi di U1ex7SMN -1G-2G-3A (pozzetto 3),

di Ulex7SMN sh2 (pozzetto 4) e di Ulex7SMN sh17 (pozzetto 5) induce un incremento significativo della percentuale di inclusione dell'esone 7. La cotrasfezione dei diversi SMN U1 snRNA modificati nel plasmide di controllo SMN1 non ha mostrato nessun effetto.

In particolare, la figura 9 mostra l'effetto degli SMN U1 modificati sullo *splicing* dell'SMN2. Nella parte superiore della figura è indicato il profilo di *splicing* dell'esone 7 del gene SMN2 (pozzetto 1) e l'effetto della coespressione degli U1 snRNA modificati (pozzetti 2-5). Le due isoforme di inclusione (+) ed esclusione (-) dell'esone 7 sono indicate. Nel pannello inferiore l'istogramma riporta la percentuale di inclusione dell'esone 7 e quindi di *splicing* corretto. I dati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

Esempio 6: Mutazioni nel sito donatore dell'esone 12 del CFTR associate a Fibrosi Cistica

La fibrosi cistica è dovuta a mutazioni nel gene CFTR. Le mutazioni localizzate nel sito di *splicing* dell'esone 12, associate a gravi forme di malattia che inducono salto dell'esone aberrante sono indicate nella tabella 6.

Tabella 6: Lista delle mutazioni nel sito donatore l' esone 12 del gene CFTR. Le mutazione sono evidenziate in grassetto

Posizione	Sostituzione nucleotidica	Sequenza del sito donatore CF esone 12 <i>Posizioni: -3 -2 -1 \</i> <i>+1+2+3+4+5+6</i>
-1	G>A	<u>AAA</u> \ <i>gtatgt</i>
+3	A>G	<u>AAG</u> \ <i>gtatgt</i>
+5	T>A	<u>AAG</u> \ <i>gtatgt</i>

Nella figura 10 c'è una rappresentazione schematica della parte centrale del costrutto pTB CFex12 usato nello studio dello *splicing*. I rettangoli rappresentano le regioni centrali del costrutto di α -globina, e dell'esone 12 del CFTR, con gli introni rappresentati come linee. L'esone 12 e le regioni introniche fiancheggianti sono state clonate nel plasmide pTB. La trascrizione è sotto il controllo del promotore dell' α -globina e dell'enhancer di SV40 enhancer. Le due possibili isoforme di *splicing* sono indicate.

Nella Tabella 7 sono elencate le Sequenze di riconoscimento (U1-SR) nel gene per le U1-snRNA modificate per la correzione dei difetti di *splicing* dell'esone 12 del gene CFTR.

Tabella 7

CFTR U1- snRNAs	Sequenza Legante (5'→3')	Sequenza bersaglio (5'→3')	Lunghezza (bp)	SEQ ID NO:
-1A+4T	ACaUACuUG	CAaGTAtGT	9	61
+3G+4T	ACacACCUg	CAGGTgtGT	9	62
+4T+5A	AuaUACCUG	CAGGTAtaT	9	63
CF_SH1	UCAAGAACAuAC	GTATGTTCTTTGA	13	10
CF_SH11	AUAAGUAAGGTAUUCa	TGAATACCTTACTTAT	16	11

La figura 11 mostra la localizzazione degli U1 snRNA modificati utilizzati per la correzione dei difetti di *splicing* dell'esone 12 del gene CFTR.

L'RNA è stato analizzato RT-PCR come indicato nell'esempio 2: trasfezione dei minigeni in cellule in coltura ed analisi dei prodotti di *splicing*, utilizzando alfa2-3 e BRA2 come inneschi. La trasfezione del mutante +5A ha mostrato che gli U1 snRNA modificati sono in grado di ripristinare il corretto *splicing* dell'esone 12 (figura 12). Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando i minigene contenenti le mutazioni -1A e +3G) In particolare il CF U1snRNA 11 induce un aumento significativo della percentuale di inclusione dell'esone 12 in questi tre difetti di *splicing*.

La figura 12 mostra gli effetti degli U1-snRNA sullo *splicing* aberrante indotto dalla mutazione -1A nel minigene pCFex12. Nella parte superiore è indicato il profilo di *splicing* della variante na-

turale +5A (pozzetto 2) e l'effetto della co-espressione delle ul-snRNA modificate (pozzetti 2-6). Le due isoforme con inclusione (+) o esclusione (-) dell'esone 12 sono indicate. Nel pannello inferiore l'istogramma riporta la percentuale di inclusione dell'esone 12, e quindi di *splicing* corretto.

I dati sono la media di 3 esperimenti indipendenti.

Le cellule sono state transfettate con 0,5 µg di vettore esprimente ogni specifica variante. Il profilo di *splicing* è stato valutato mediante RT-PCR con i primer ALPHA2,3 e BRA2. I frammenti amplificati sono stati separati su gel di agaroso al 2%. L'identità dei trascritti includenti (+) o escludenti (-) l'esone 12 è indicata sulla destra del gel ed è stata validata mediante sequenziamento.

Esempio 7: Mutazioni esoniche nell' esone 12 del CFTR associate a Fibrosi Cistica

Alcune mutazioni localizzate nell'esone 12 possono indurre un difetto di *splicing* (8) che comporta la esclusione di questo esone dal trascritto maturo. Le mutazioni che inducono esclusione dell'esone 12 sono indicate nella Tabella 8. I minigene utilizzati sono rappresentati nella figura 13. I rettangoli nella figura rappresentano le regioni

centrali del costrutto di α -globina e dell'esone 12 del CFTR, con gli introni rappresentati come linee. La posizione delle due mutazioni esoniche è indicata. L'esone 12 e le regioni introniche fiancheggianti sono state clonate nel plasmide pTB. La trascrizione è sotto il controllo del promotore dell' α -globina e dell'enhancer di SV40 enhancer. Le due possibili isoforme di *splicing* sono indicate nella figura. Le sequenze bersaglio e la localizzazione dei CF U1 snRNA sono come indicati nell'esempio precedente.

Tabella 8

Sostituzione Nucleotidica	Sostituzione aminoacidica	Posizione nell'esone
G>A	A566T	+17
C>T	Y577Y	+52

L'RNA è stato analizzato RT-PCR come indicato nell'esempio 2: trasfezione dei minigeni in cellule in coltura ed analisi dei prodotti di *splicing*, utilizzando alfa2-3 e BRA2 come inneschi. In confronto alla trasfezione del plasmide normale pTBCFex12WT, la trasfezione del plasmide pTBCFex12A566T induce un calo significativo nella percentuale di inclusione dell'esone 12 (figura 14, pozzetti 1 e 2). La cotrasfezione di alcuni U1 modificati e specificatamente lo U1ex12CF +4T+5G e

Ulex12CF sh11 (pozzetti 4 e 6 induce un aumento significativo della percentuale di inclusione dell'esone 12. Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando il minigene contenente la mutazione Y577Y. In particolare il CF U1 snRNA 11 induce un aumento significativo della percentuale di inclusione dell'esone 12 in questi due difetti esonici di *splicing*.

La figura 14 mostra in particolare gli effetti dei CF U1-snRNA sullo *splicing* aberrante indotto dalla mutazione A566T nel minigene pCFex12. Nella parte superiore della figura è indicato il profilo di *splicing* della variante naturale A566T (pozzetto 2) e l'effetto della coespressione delle ul-snRNA modificate (pozzetti 2-8). Le due isoforme con inclusione (+) o esclusione (-) dell'esone 12 sono indicate. Nel pannello inferiore l'istogramma riporta la percentuale di inclusione dell'esone 12, e quindi di *splicing* corretto. I dati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

Le cellule sono state transfettate con 0,5µg di vettore esprimente ogni specifica variante. Il profilo di *splicing* è stato valutato mediante RT-PCR con i primers ALPHA2,3 e BRA2. I frammenti amplificati sono stati separati su gel di agaroso al 2%.

L'identità dei trascritti includenti (+) o escludenti (-) l'esone 12 è indicata sulla destra del gel, ed è stata validata mediante sequenziamento.

RIFERIMENTI

1. Cartegni, L., S. L. Chew, and A. R. Krainer. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285-98.
2. Hua, Y., T. A. Vickers, B. F. Baker, C. F. Bennett, and A. R. Krainer. 2007. Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol* 5:e73.
3. Hua, Y., T. A. Vickers, H. L. Okunola, C. F. Bennett, and A. R. Krainer. 2008. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet* 82:834-48.
4. Lorson, C. L., H. Rindt, and M. Shababi. Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies. *Hum Mol Genet* 19:R111-8.
5. Pagani, F., and F. E. Baralle. 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* 5:389-96.
6. Pagani, F., E. Buratti, C. Stuani, R. Bendix, T. Dork, and F. E. Baralle. 2002. A new type of mu-

tation causes a splicing defect in ATM. Nat Genet 30:426-9.

7. Pagani, F., E. Buratti, C. Stuani, M. Romano, E. Zuccato, M. Niksic, L. Giglio, D. Faraguna, and F. E. Baralle. 2000. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. J Biol Chem 275:21041-7.

8. Pagani, F., C. Stuani, M. Tzetis, E. Kanavakis, A. Efthymiadou, S. Doudounakis, T. Casals, and F. E. Baralle. 2003. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. Hum Mol Genet 12:1111-20.

9. Pinotti, M., L. Rizzotto, D. Balestra, M. A. Lewandowska, N. Cavallari, G. Marchetti, F. Bernardi and F. Pagani. I. Maestri, F. Pagani, and F. Bernardi. 2008. U1-snRNA mediated rescue of mRNA processing in severe factor VII deficiency. Blood 111:2681-2684

10. Pinotti, M., D. Balestra, L. Rizzotto, I. Maestri, F. Pagani, and F. Bernardi. 2009. Rescue of coagulation factor VII function by the U1+5A snRNA. Blood 113:6461:6464

RIVENDICAZIONI

1. Molecola di UlsnRNA umano modificato, caratterizzata dal fatto che una porzione della sequenza nucleotidica a singolo filamento della regione 5' del UlsnRNA umano *wild-type* è sostituita con una sequenza nucleotidica legante a singolo filamento atta a ibridarsi con una sequenza nucleotidica bersaglio sul pre-mRNA trascritto da un gene bersaglio di interesse terapeutico recante una mutazione inducente *splicing* aberrante, la sequenza nucleotidica bersaglio essendo situata in una regione del pre-mRNA del gene bersaglio compresa fra le 50 paia di basi a monte e le 100 paia di basi a valle di un sito di giunzione esone/introne il cui *splicing* è influenzato dalla suddetta mutazione, con la condizione che la sequenza nucleotidica bersaglio non comprenda il suddetto sito di giunzione esone/introne.

2. Molecola di UlsnRNA umano modificato secondo la rivendicazione 1, in cui la sequenza nucleotidica bersaglio ha una lunghezza di 5 a 50 nucleotidi, preferibilmente 9 a 30 nucleotidi.

3. Molecola di UlsnRNA umano modificato secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la porzione della regione 5' che è sostituita con la sequenza nucleoti-

dica legante ha una lunghezza di 9 a 12 nucleotidi.

4. Molecola di U1snRNA umano modificato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui la mutazione inducente *splicing* aberrante è una mutazione atta a causare *skipping* dell'esone o una mutazione atta a creare un sito donatore criptico.

5. Molecola di U1snRNA umano modificato secondo la rivendicazione 4, in cui la mutazione è nell'introne, nell'esone o nel sito donatore per lo *splicing*.

6. Molecola di U1snRNA umano modificato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui il gene bersaglio di interesse terapeutico è il gene del fattore IX della coagulazione, il gene SMN2 o il gene CFTR.

7. Molecola di U1snRNA umano modificato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui la sequenza nucleotidica legante è scelta dal gruppo che consiste di SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

8. Molecola di U1snRNA umano modificato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7, per l'uso nel trattamento terapeutico di una patologia genetica causata o associata a *splicing* aberrante.

9. Molecola di U1snRNA umano modificato secondo la

rivendicazione 8, in cui la patologia è fibrosi cistica, emofilia B o atrofia muscolo spinale.

10. Gene isolato codificante per una molecola di UlsnRNA umano modificato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7.

11. Gene isolato secondo la rivendicazione 10, comprendente una sequenza promotore e una sequenza segnale di poliadenilazione.

12. Gene isolato secondo la rivendicazione 11, in cui il promotore è il promotore endogeno del gene codificante per UlsnRNA umano.

13. Gene isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10 a 12, per l'uso nel trattamento terapeutico di una patologia genetica causata da *splicing* aberrante.

14. Gene isolato secondo la rivendicazione 13, in cui la patologia è fibrosi cistica, emofilia B o atrofia muscolo spinale.

15. Vettore di espressione comprendente un gene isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10 a 12.

16. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 15, che è un vettore adenovirale.

17. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 15 o 16, per l'uso nel trattamento terapeutico

di una patologia genetica causata o associata a *splicing* aberrante.

18. Vettore di espressione secondo la rivendicazione 17, in cui la patologia è fibrosi cistica, emofilia B o atrofia muscolo spinale.

19. Composizione farmaceutica comprendente una molecola di UlsnRNA umano modificato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7, o un gene isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10 a 12, o un vettore di espressione secondo la rivendicazione 15 o 16, e un veicolo farmaceuticamente accettabile.

20. Procedimento *in vitro* per ripristinare in una cellula in coltura il corretto *splicing* di un gene bersaglio di interesse terapeutico recante una mutazione inducente *splicing* aberrante, comprendente transfettare la cellula in coltura con un vettore di espressione secondo la rivendicazione 15 o 16.

CLAIMS

1. A modified human U1snRNA molecule, characterized in that a portion of the single-stranded nucleotide sequence of the 5' region of the *wild-type* human U1snRNA is replaced by a binding single-stranded nucleotide sequence capable of hybridizing to a target nucleotide sequence on the pre-mRNA transcribed from a target gene of therapeutic interest bearing a mutation which induces aberrant splicing, the target nucleotide sequence being located in a region of the pre-mRNA of the target gene comprised between 50 base pairs upstream and 100 base pairs downstream of a exon/intron junction site whose splicing is affected by said mutation, provided that the target nucleotide sequence does not comprise said exon/intron junction site.
2. The modified human U1snRNA molecule according to claim 1, wherein the target nucleotide sequence is 5 to 50 nucleotides in length, preferably 9 to 30 nucleotides.
3. The modified human U1snRNA molecule according to claim 1 or 2, wherein the portion of the 5' region which is replaced by the binding nucleotide sequence is 9 to 12 nucleotides in length.
4. The modified human U1snRNA molecule according

to any of claims 1 to 3, wherein the mutation inducing aberrant splicing is a mutation capable of causing exon skipping or a mutation capable of creating a cryptic donor site.

5. The modified human U1snRNA molecule according to claim 4, wherein the mutation is in the intron, in the exon or in the donor splice site.

6. The modified human U1snRNA molecule according to any of claims 1 to 5, wherein the target gene of therapeutic interest is the coagulation factor IX gene, the SMN2 gene or the CFTR gene.

7. The modified human U1snRNA molecule according to any of claims 1 to 5, wherein the binding nucleotide sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11.

8. The modified human U1snRNA molecule according to any of claims 1 to 7, for use in the therapeutic treatment of a genetic disease caused by or associated with aberrant splicing.

9. The modified human U1snRNA molecule according to claim 8, wherein the disease is cystic fibrosis, hemophilia B or spinal muscular atrophy.

10. An isolated gene coding for a modified human U1snRNA molecule according to any of claims 1 to 7.

11. The isolated gene according to claim 10, comprising a promoter sequence and a polyadenylation signal sequence.

12. The isolated gene according to claim 11, wherein the promoter is the endogenous promoter of the gene coding for human UlsnRNA.

13. The isolated gene according to any of claims 10 to 12, for use in the therapeutic treatment of a genetic disease caused by aberrant splicing.

14. The isolated gene according to claim 13, wherein the disease is cystic fibrosis, hemophilia B or spinal muscular atrophy.

15. An expression vector comprising an isolated gene according to any of claims 10 to 12.

16. The expression vector according to claim 15, which is a adenoviral vector.

17. The expression vector according to claim 15 or 16, for use in the therapeutic treatment of a genetic disease caused by or associated with aberrant splicing.

18. The expression vector according to claim 17, wherein the disease is cystic fibrosis, hemophilia B or spinal muscular atrophy.

19. A pharmaceutical composition comprising a modified human UlsnRNA molecule according to any of

claims 1 to 7, or an isolated gene according to any of claims 10 to 12, or an expression vector according to claim 15 or 16, and a pharmaceutically acceptable vehicle.

20. An *in vitro* method to restore in a cell culture the correct splicing of a target gene of therapeutic interest bearing a mutation which induces aberrant splicing, comprising transfecting the cell culture with an expression vector according to claim 15 or 16.

Figura 1

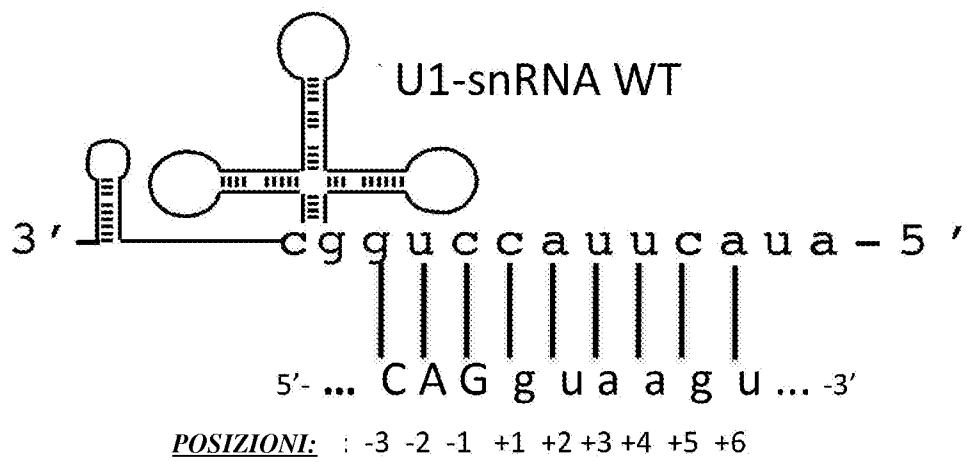


Figura 2

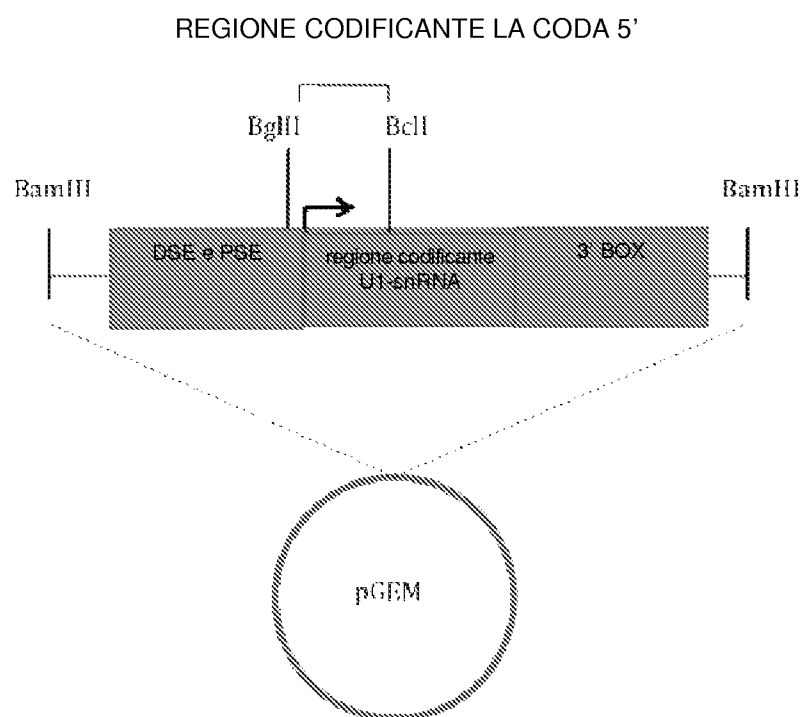


Figura 3

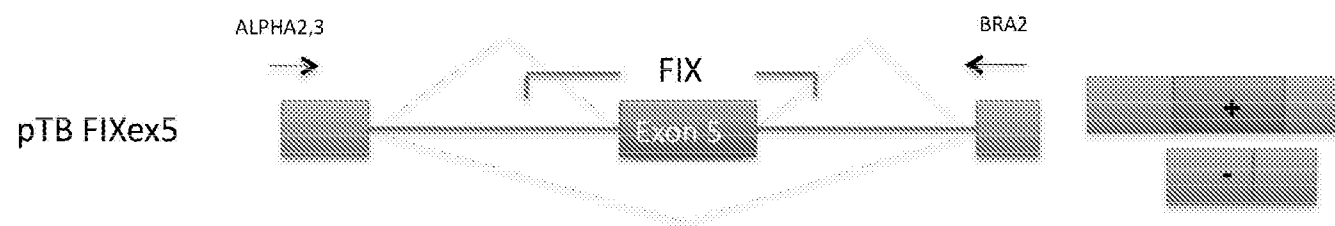


Figura 4

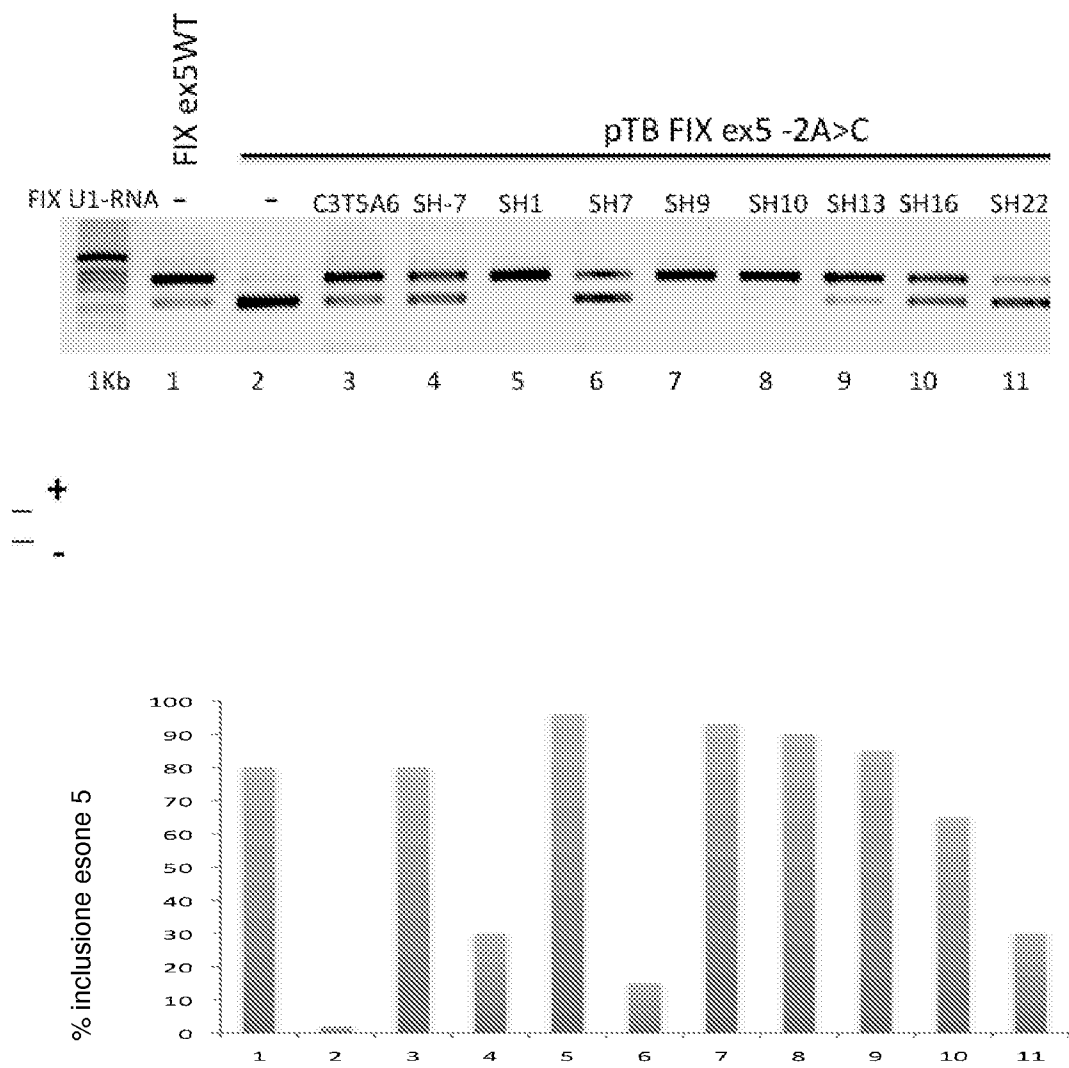


Figura 5

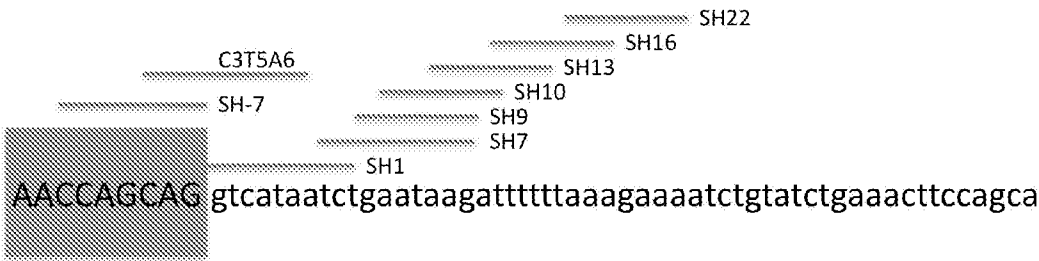


Figura 6

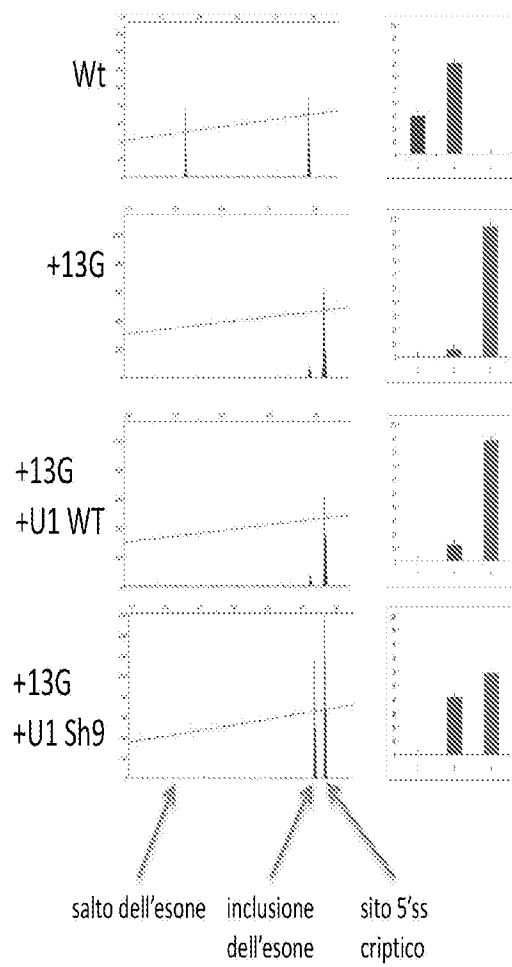


Figura 7

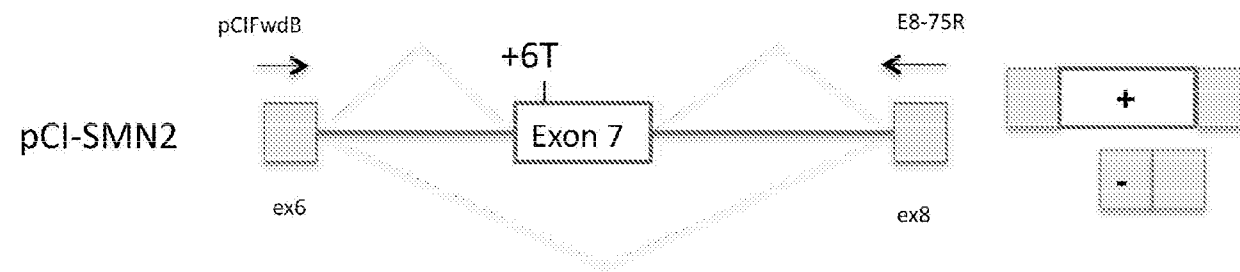


Figura 8

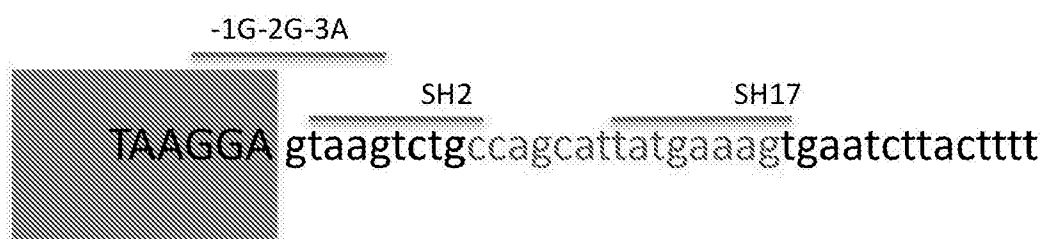


Figura 9

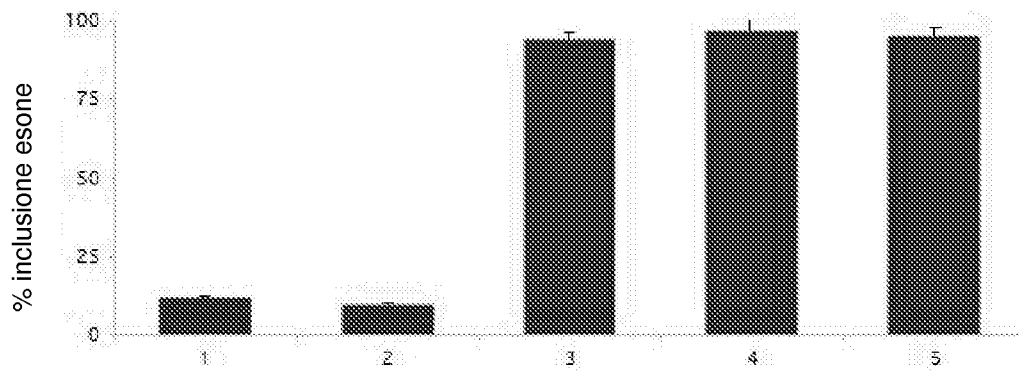
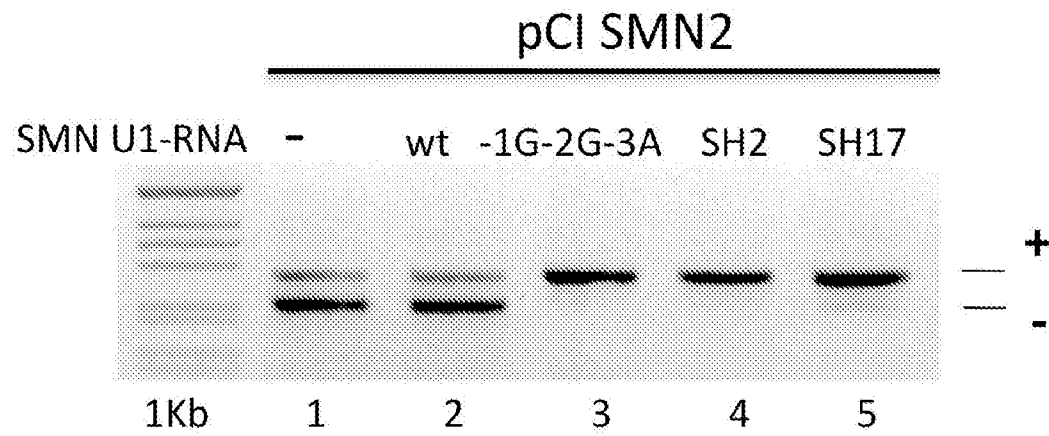


Figura 10

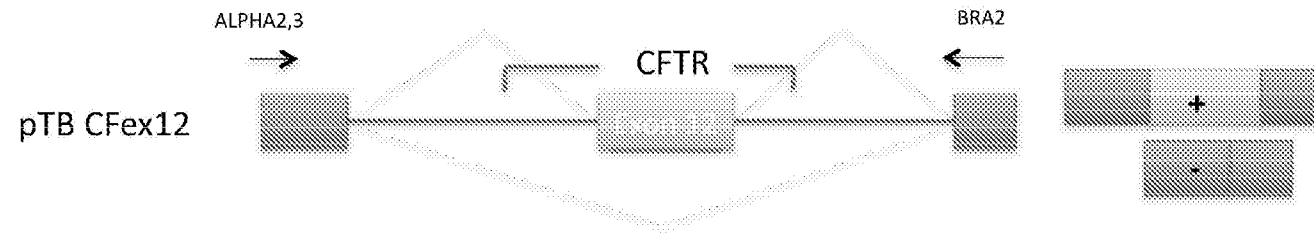


Figura 11

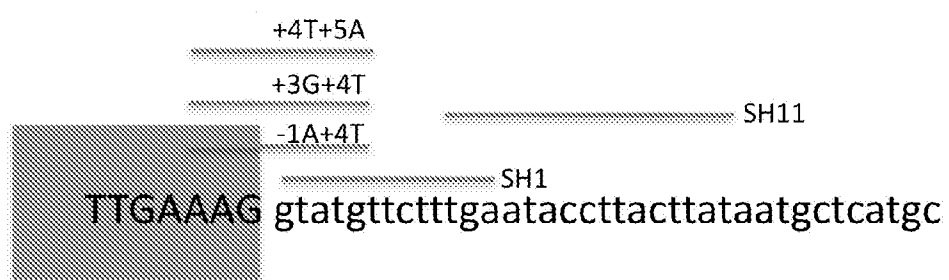


Figura 12

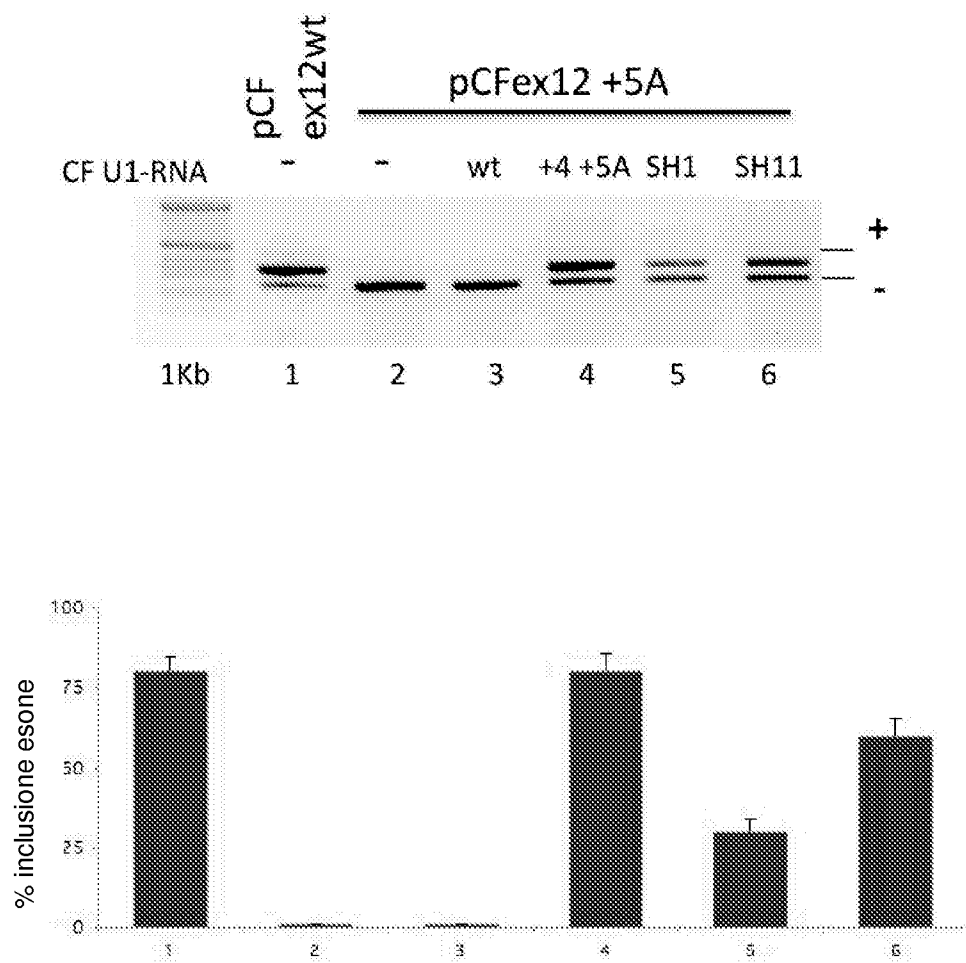


Figura 13

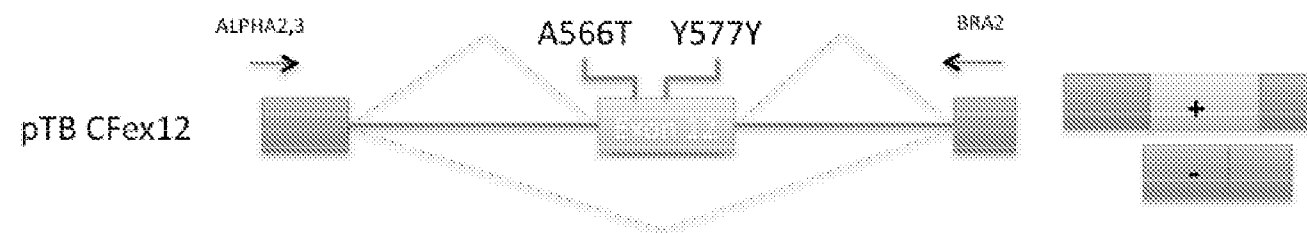


Figura 14

