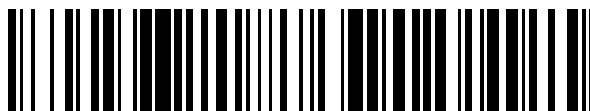


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 651**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/712** (2006.01)

**A61K 31/7125** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2016 PCT/EP2016/055360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16142538**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2016 E 16709465 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3268474**

54 Título: **Emparejamiento de oligonucleótidos con el exón 73 de col7a1 para la terapia de la epidermólisis ampollosa**

30 Prioridad:

**11.03.2015 GB 201504124**

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

**28.01.2021**

73 Titular/es:

**WINGS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
2600 Tenth Street, No.435  
Berkeley, CA 94710, US**

72 Inventor/es:

**HAISMA, ELISABETH, MARLENE;  
POTMAN, MARKO;  
BEUMER, WOUTER y  
BRINKS, VERA**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 803 651 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

Emparejamiento de oligonucleótidos con el exón 73 de col7a1 para la terapia de la epidermólisis ampullosa

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a oligonucleótidos adecuados para su uso en el tratamiento de enfermedades humanas. Más en particular, la presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido adecuados para el tratamiento de la epidermólisis ampullosa distrófica.

### Antecedentes de la enfermedad

10 La epidermólisis ampullosa (EA) es un grupo de enfermedades hereditarias de la piel, que se caracterizan por fragilidad crónica y formación de ampollas en la piel y en las membranas mucosas. Dependiendo del subtipo, el espectro de síntomas de la EA es muy amplio, que varía desde mínima fragilidad de la piel hasta síntomas muy graves con complicaciones generales. A nivel mundial, están afectados aproximadamente 350 000 pacientes. En algunas formas de la EA, también las uñas, el cabello y los dientes pueden estar involucrados. Los principales tipos de EA incluyen EA Simple (EAS), EA de unión (EAU), EA distrófica (EAD) y síndrome de Kindler (SK).

15 La EAD afecta a aproximadamente el 25 % de los pacientes con EA, puede heredarse de forma dominante o recesiva e implica defectos en el colágeno tipo VII (COL7A1, omim 120120). COL7A1 codifica la cadena alfa 1 de colágeno VII. El colágeno VII funciona como una fibrilla de anclaje de la parte superior de la dermis a la lámina densa (parte de la membrana basal). Después de la modificación postraducciona, tres cadenas alfa 1 idénticas se pliegan junto con su dominio de la triple hélice de colágeno. Posteriormente, se forman dímeros antiparalelos que se alinean para formar las fibrillas de anclaje. Los queratinocitos y los fibroblastos dérmicos sintetizan el colágeno VII en la piel. La gravedad de la enfermedad EAD se correlaciona de manera general con la cantidad de expresión de colágeno tipo VII en la zona de la membrana basal.

20 Las características de la EA distrófica dominante (EADD) incluyen formación de ampollas que pueden localizarse en las manos, pies, codos y rodillas o generalizadas. Los hallazgos comunes incluyen cicatrices, milios, afectación de la membrana mucosa y uñas anormales o ausentes. La EA distrófica recesiva (EADR) suele ser más generalizada y grave que la EADD. Además de los hallazgos de la EADD, otras manifestaciones comunes de la EADR incluyen desnutrición, anemia, osteoporosis, estenosis esofágicas, retraso del crecimiento, membrana interdigital o fusión de los dedos de manos y pies causando deformidad en mitón (o manopla) (pseudosindactilia), desarrollo de contracturas musculares, malformación de dientes, microstomía y cicatrización del ojo. El riesgo de carcinoma epidermoide aumenta enormemente en este grupo, así como la muerte por carcinoma epidermoide metastásico.

30 Dentro del gen COL7A1 se conocen más de 400 mutaciones diferentes. Uno de los exones afectados más frecuentes (18 % de los pacientes) es el exón 73 con aproximadamente 40 mutaciones conocidas, con mayor frecuencia mutaciones de sentido equivocado o mutaciones que conducen a codones de terminación prematura (PTC, siglas del inglés *Premature Termination Codons*) y sustituciones de glicina.

35 Actualmente no hay tratamiento para la EAE, solo se realizan cuidados paliativos. Las formas graves de EADR imponen un coste elevado en el presupuesto sanitario de la sociedad: el coste promedio de apósitos y medicamentos es de aproximadamente 200 000 € por paciente al año.

40 En el documento WO2013/053819 del Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM) se desvelan dos oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 73, haciendo que se omita todo el exón del ARNm. El ARNm carente de exón 73, se traduce en un polipéptido funcional que, aunque es más corto que la proteína wt, se comporta de manera muy similar al colágeno VII de tipo silvestre. Un oligonucleótido desvelado tiene una longitud de 25 nucleótidos, mostrando una eficiencia de omisión del 69 %, mientras que el otro tiene una longitud de 30 nucleótidos, mostrando una eficiencia de omisión del 93 %.

### Sumario de la invención

45 Aunque en el documento WO2013/053819, el AON (*antisense oligonucleotide*, oligonucleótido antisentido) de omisión de exón más largo parece mostrar una eficacia satisfactoria en cuanto a la omisión de exones, su longitud y algunas otras características lo hacen menos preferido desde la perspectiva del desarrollo de dicha molécula para su uso terapéutico en seres humanos. Además de esto, parece que este oligonucleótido produce bandas intermedias que no son representativas ni de los ARNm de tipo silvestre ni de los que carecen del exón 73. Aunque no se sabe si estas bandas tienen relevancia clínica, la producción de subproductos es menos preferida desde un punto de vista legislativo y de seguridad. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de más y mejores terapias para tratar la EAD.

50 Por tanto, la invención proporciona un oligorribonucleótido antisentido capaz de impedir o reducir la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1 humano, cuando dicho ARNm se produce mediante el corte y empalme de un pre-ARNm en una célula de mamífero, caracterizado porque el oligorribonucleótido es capaz de emparejarse con el elemento (ESE/de unión a SRp40/SC35) en el exón 73 caracterizado por la secuencia 5'-UUUCCUGG-3' (SEQ ID NO: 4), en el que oligorribonucleótido tiene una longitud de entre 16 y 24 nucleótidos. Este oligonucleótido puede incluir como

máximo dos secuencias de CpG.

Los oligorribonucleótidos de la invención pueden ser útilmente oligorribonucleótidos con enlaces internucleosídicos modificados, por ejemplo, enlaces de fosforotioato. También pueden tener azúcares modificados, por ejemplo, con restos de azúcares sustituidos con 2'-O-metilo. Estos y otros detalles de los oligonucleótidos se analizan a continuación.

### **Descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra el exón 73 de Col7A1 humano (SEQ ID NO: 1; en mayúsculas) con sus límites intrónicos 5' y 3' flanqueantes (SEQ ID NO: 2 y 3; en minúsculas).

La Figura 2 muestra la ubicación de sitios de unión a proteínas SR en el exón 73 y la ubicación de los AON.

La Figura 3 muestra resultados de nanolaboratorio (*lab-on-a-chip*) de la omisión de exones en células de fibroblastos humanos primarios (FHP). El ARNm de longitud completa da una banda a ~ 350 pb, mientras que la del ARNm con el exón 73 excluido es de ~ 150 pb.

La Figura 4 muestra los resultados histológicos del suministro de mh-AON1 formulado en PBS utilizando un modelo de piel porcina *ex vivo*. 4A-4B muestran los resultados de tener 25 µg de mh-AON1 en piel intacta durante 24 horas, 4C-4F muestran los resultados de tener 25 µg de mh-AON1 sobre piel ampollosa, con toda la epidermis eliminada. C-D: incubación durante 24 horas. (E-F): incubación durante 48 horas. mh-AON1 está teñido (rojo). La barra de escala es de 100 µm.

La Figura 5 muestra los resultados histológicos del suministro de mh-AON1 formulado en tres hidrogeles diferentes utilizando el mismo modelo de piel porcina *ex vivo* que el de la Figura 4. 5A-5B muestran los resultados de piel porcina tratada con controles de solución salina (A) con la epidermis intacta y (B) con la epidermis eliminada. 5C-5D muestran la piel porcina tratada con 50 µg de mh-AON1-cy5 mezclado en Flaminal™, (C) con la epidermis intacta (D) con la epidermis eliminada. 5E-5F muestran los resultados con piel porcina tratada con 50 µg de mh-AON1-cy5 mezclado en hidrogel de carbómero, (E) con la epidermis intacta y (F) con la epidermis eliminada. 5G-5H muestran los resultados con piel porcina tratada con 50 µg de mh-AON1-cy5 mezclado en hidrogel de hipromelosa, (G) con la epidermis intacta y (H) con la epidermis eliminada. La barra de escala indica 100 µm. mh-AON1 está teñido (rojo).

La Figura 6 muestra resultados de nanolaboratorio de productos de corte y empalme de ARNm de COL7A1 después del tratamiento con mh-AON1 o con la variante de secuencia aleatoria (SCRM, *scrambled*) como un oligo (oligonucleótido) de control. Se analizaron dos tipos de células diferentes (HeLa y FHP), ambos con oligonucleótido 100 nM durante 24 h (los cuatro carriles de la izquierda) o 40 h (los 4 carriles de la derecha). Después del tratamiento con mh-AON1 o con oligo de control (incluyendo y excluyendo el exón 73), se formaron diferentes productos de ARNm de COL7A1. Se analizaron los diferentes productos de ARNm para determinar su longitud; el fragmento de 350 nucleótidos representa el ARNm de tipo silvestre de longitud completa y el fragmento de 150 nucleótidos el producto de ARNm modulado.

La Figura 7 muestra el diseño de los cebadores para el ensayo de ddPCR (siglas del inglés *droplet digital PCR*, PCR digital en nanogotas). Se diseñaron dos combinaciones diferentes de cebadores para la PCR, ya sea solo el producto de tipo silvestre (parte superior) o el producto  $\Delta$  exón 73 (parte inferior). Fila superior: par de cebadores para el tipo silvestre; Fila inferior: par de cebadores para el exón 73 omitido.

La Figura 8 muestra la cuantificación absoluta (% del total de copias; eje y) de transcritos de ARNm de COL7A1 que incluyen el exón 73 y que excluyen el exón 73, en células de FHP que llevan una secuencia COL7A1 inalterada. Se realizó un perfil de respuesta a la dosis con mh-AON1, con 50, 100 y 200 nM (eje x). Los resultados se muestran 24 horas (izquierda) o 40 horas (derecha) después de la transfección con el oligonucleótido. Las barras negras representan el producto de longitud completa, mientras que las barras grises representan la transcripción  $\Delta$ 73.

La Figura 9 muestra los resultados de la evaluación de inmunogenicidad e inmunotoxicidad de mh-AON1 en PBMC humanas. (a) Matriz cromática que representa los niveles de significación de concentraciones de citocina en sobrenadante de cultivo después de 24 h de estimulación de PBMC humanas con mh-AON1 (10 nM, 100 nM o 1 µM) o con los controles positivos Poli(I:C) (1 µg/ml), CpG (10 µg/ml), LPS (100 ng/ml) y R848 (1 µM), en comparación con los de PBMC humanas tratadas con solución salina. Cada cuadrado muestra el nivel de significación alcanzado por condición de tratamiento (media geométrica de los cinco donantes humanos con mediciones por triplicado cada uno) para cada citocina medida. (b) Factor de cambio de la concentración de IFN- $\alpha$ 2 en el sobrenadante de cultivo después de 24 horas de estimulación de PBMC con mh-AON1 o con los controles positivos en comparación con las PBMC tratadas con solución salina. Las barras representan la media con EEM (error típico de la media) de mediciones por triplicado por donante humano (en diferentes tonos grises). La línea discontinua en 1 representa la concentración relativa de citocinas de las PMBC tratadas con solución salina. Los valores de P en (a) y (b) se determinaron utilizando la prueba de Friedman con la prueba *a posteriori* de Dunn (c) Número relativo de PBMC viables expresado como factor de cambio de fluorescencia de Resorufina en comparación con el de las PBMC tratadas con solución salina después de 24 h de exposición a mh-AON1 o a los

controles positivos. La evaluación de células viables se realizó utilizando el kit CellTiter-Blue. Para todas las copias biológicas individuales, los factores de cambio se calcularon normalizando la UFR (unidad de fluorescencia relativa) medida frente a la media geométrica del control salino por triplicado correspondiente. Los resultados se muestran por donante individual como la media  $\pm$  EEM del factor de cambio por triplicado, normalizado frente a la media de su correspondiente control con solución salina (línea discontinua). Se realizó ANOVA unidireccional de mediciones repetidas con prueba de Dunnett para correcciones múltiples (en comparación con solución salina). (\* $P < 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\*\* $P < 0,001$ ).

La Figura 10 muestra los resultados de la evaluación de inmunogenicidad e inmunotoxicidad de mh-AON1 y AON73.24.5 en células Ramos-Blue humanas. (a) Activación de NF-kB/AP-1 en células Ramos-Blue después de 24 h de incubación con mh-AON1 o AON73.24.5 (a varias concentraciones) y a los agonistas de TLR Poli(I:C) (1  $\mu\text{g/ml}$ ), CpG (10  $\mu\text{g/ml}$ ), LPS (100  $\text{ng/ml}$ ) y R848 (1  $\mu\text{M}$ ). (b) Número relativo de células Ramos-Blue viables, expresado como factor de cambio de fluorescencia de resorufina en comparación con células Ramos-Blue tratadas con solución salina después de 24 horas de exposición a mh-AON1, AON73.45.5 o a los controles positivos. La evaluación de células viables se realizó utilizando el kit CellTiter-Blue. Para todas las copias biológicas individuales, los factores de cambio se calcularon normalizando la D.O. (Densidad Óptica) medida frente a la media geométrica del control salino por triplicado correspondiente. Los resultados se muestran como la media + EEM del factor de cambio por triplicado, normalizado frente a la media de su correspondiente control con solución salina (línea discontinua). Se realizó ANOVA unidireccional de mediciones repetidas con prueba de Dunnett para correcciones múltiples (en comparación con solución salina) en los valores de factor de cambio. (\*\*\*\* $P < ,0001$ ).

### **Descripción detallada de la invención**

Sorprendentemente, los inventores han descubierto ahora que pueden diseñarse oligonucleótidos antisentido que cumplan con los requisitos para que un AON los desarrolle en opciones terapéuticas para tratar enfermedades humanas, en particular, la epidermólisis ampollosa distrófica (EAD).

Aunque el AON 73.3 desvelado en el documento WO2013/053819 parece ser satisfactorio en cuanto a reducir la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1, este oligonucleótido, con una longitud de 30 nt., es innecesariamente largo, y es menos preferido desde un punto de vista de capacidad de producción, CMC y costes materiales. Por otra parte, los oligonucleótidos INSERM contienen múltiples repeticiones CpG, y son menos preferidos desde un punto de vista de inmunogenicidad. Se sabe que las CpG, especialmente sus repeticiones, interaccionan con el receptor TLR9, causando así una respuesta inmunitaria en el individuo tratado que puede dañar el rendimiento y/o causar daño a los tejidos tratados con el oligonucleótido.

Los AON de la invención tienen una longitud menor de 25, preferentemente, menor de 24, y pueden impedir, o al menos reducir, la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1 con alta eficacia y, en comparación con los de la técnica anterior, tienen menos estructuras o secuencias (y preferentemente no tienen) que puedan obstaculizar la funcionalidad.

El ARNm acortado, desprovisto de todo el exón 73 como resultado del tratamiento utilizando los AON de la invención, se traducirá en una proteína COL VII más corta pero funcional.

Preferentemente, los AON de la invención no contienen más de dos (preferentemente sólo una o incluso ninguna) secuencia(s) de CpG y su longitud varía entre 16 y 24 nucleótidos, mientras que, como se mide en células HeLa, alcanzan eficacias de omisión de exón de más del 60 % (por ejemplo, más del 70 %, idealmente más del 75 % u 80 %, preferentemente más del 85 %, y aún más preferentemente más del 90 %).

Los AON se han diseñado para poder emparejarse con un motivo octamérico (*8-mer*) que, hasta ahora, no se reconocía como que era importante en la selección del exón 73 que flanquea el sitio aceptor de corte y empalme en la posición 5'. Se supone que este motivo octamérico (8 meros) es un potenciador de corte y empalme exónico (ESE, *exonic splicing enhancer*), previamente inadvertido, que puede direccionarse para impedir, o al menos reducir, la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1. Los inventores utilizaron una técnica de microwalk para determinar la ubicación de este supuesto ESE recientemente reconocido, utilizando AON capaces de emparejarse con todo el motivo o con una parte del mismo, diseñando diferentes AON que se truncan progresivamente para acortar el solapamiento con este motivo hasta que se pierda por completo la omisión de exón. Al hacerlo, los inventores identificaron un motivo 5'-UUUCCUGG-3' (SEQ ID NO: 4) en la región 5' del exón 73 (véase la Figura 1) que forma una nueva diana excelente para que los AON logren impedir, o al menos reducir, la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1.

En una realización adicional de la invención, se desvela un AON que es capaz de impedir, o al menos reducir, de manera eficaz, la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1 tanto en ratones como en seres humanos. Este AON (m-h AON1) es completamente complementario el pre-ARNm diana tanto en ratones como en seres humanos. Este AON tiene la ventaja de que puede utilizarse para realizar estudios de viabilidad y de toxicología en ratones utilizando exactamente la misma molécula que la que eventualmente se desarrollará para su uso terapéutico en seres humanos.

Ninguno de los AON según la invención, parece producir bandas intermedias; solo parecen generarse bandas correspondientes al ARNm de ts (tipo silvestre) o bandas correspondientes a un ARNm completo menos el exón 73, en células tratadas con los AON según la invención.

Una propiedad preferida adicional de los AON según la invención, es que no contienen tétradas G o múltiples G (3 o más guanosinas consecutivas), evitando así que se produzcan problemas asociados con la formación de complejos múltiplex y/o con la solubilidad.

5 La Tabla 1 muestra la eficacia de omisión del exón 73 en células HeLa de cada AON, la secuencia de nucleótidos y la SEQ ID NO de los AON preferidos según la invención (AON1 - AON25 y m-hAON1), de los AON utilizados en la micro-walk para identificar el nuevo motivo ESE (AON26-30), y de las versiones truncadas de los AON encontrados que se unen a este motivo ESE que carecen de estructuras no deseables, tales como tétradas G (AON24.1 a 24.5), al mismo tiempo que muestran eficacias satisfactorias de omisión de exón. En el Ejemplo1 se ofrecen más detalles sobre los AON, su eficacia en otras células y la comparación con los AON de la técnica anterior.

10 **Tabla 1:** Eficacia de la exclusión del exón 73 del ARNm. Durante 24 horas, se trataron células de FHP y HeLa con AON 100 nm.

	HeLa	AON secuencia 5' - 3'	SEQ ID NO
AON1	86 %	UCUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	5
AON2	85 %	AGCCCGCGUUCUCCAGGAAAGCCGA	6
AON3	92 %	GUCGCCUUCAGCCCGUUCUCCA	7
AON4	83 %	ACGGUCGCCUUCAGCCCGGUU	8
AON5	3 %	CCCCUGAGGGCCAGGGUCUCCACGG	9
AON6	0 %	CAGACCAGGUGGCCUUGAGGGCCA	10
AON7	0 %	CCAAGGGCCAGACCAGGUGGCC	11
AON8	0 %	CCAGACCAGGUGGCCUUGAGGGCC	12
AON9	0 %	UCUCCCAAGGGCCAGACCAGG	13
AON10	0 %	GGAAGGCCGGGGGGCCUUCUC	14
AON11	6 %	CCGGCAAGGCCGAAGGCCGGGG	15
AON12	0 %	AGGCUUCCAGGCUCGCCGCAAG	16
AON13	2 %	CGGGAUACCAGGCUUCCAGGCU	17
AON14	25 %	UGCCUGGGAGCCGGAAUACCA	18
AON15	8 %	CCCACACCCAGCCUUGCCUGGG	19
AON16	0 %	CCUCUCCACACCCAGCCU	20
AON17	9 %	UCUCUCCUGCCUUCUGCCUCU	21
AON18	13 %	CACCCUCUCUCCUGCCUUCU	22
AON19	7 %	CCAGCCUCACCCUCUCUCCUGG	23
AON20	100 %	CUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	24
AON21	89 %	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	25
AON22	85 %	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	26
AON23	83 %	CUCCAGGAAUCCGAUGGGGCC <sub>cu</sub>	27
AON24	93 %	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC <sub>cug</sub>	28
AON24.1	73 %	UCCAGGAAAGCCGAUGGG	39
AON24.2	88 %	UCCAGGAAAGCCGAUGG	40
AON24.3	79 %	UCCAGGAAAGCCGAUG	41
AON24.4	86 %	CUCCAGGAAAGCCGAUGG	42
AON24.5	89 %	UCUCCAGGAAAGCCGAUG	43
AON25	92 %	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCC <sub>cugc</sub>	29
AON26	49 %	AGGAAAGCCGAUGGGGCC <sub>cugcag</sub>	30
AON27	37 %	GAAAGCCGAUGGGGCC <sub>cugcagga</sub>	31
AON28	47 %	AAGCCGAUGGGGCC <sub>cugcaggagu</sub>	32
AON29	0 %	GCCGAUGGGGCC <sub>cugcaggagugg</sub>	33
AON30	7 %	GAUGGGGCC <sub>cugcaggaguggaa</sub>	34
mh-AON 1	91 %	CGUUCUCCAGGAAAGCCGAUG	35

Según una realización, se proporciona un oligorribonucleótido antisentido que tiene una longitud de entre 16 y 24 nucleótidos que es capaz de impedir o reducir la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1 de un mamífero (preferentemente un ser humano), cuando dicho ARNm se produce mediante el corte y empalme de un pre-ARNm en una célula de mamífero, caracterizado porque el oligorribonucleótido es capaz de hibridarse con el motivo de secuencia 5'-UUUCCUGG-3' (SEQ ID NO: 4) en la parte del exón 73 en dirección 5' (figura 1). Sin desear quedar ligado a teoría

15

alguna, se supone que este motivo representa un elemento potenciador de corte y empalme exónico (ESE, por las siglas del inglés *Exonic Splicing Enhancer*) de unión a SRp40/SC35. Los AON según esta realización se caracterizan preferentemente porque la secuencia del oligonucleótido tiene como máximo dos secuencias de CpG. Para tener un efecto óptimo, el oligonucleótido debería emparejarse con todo el motivo octamérico (8 meros); si las eficiencias de omisión de exón por debajo del 60 % fueran aceptables para cualquier escenario particular, entonces el emparejamiento con los 6 o 7 nucleótidos más en posición 5' del motivo octamérico podría ser aceptable.

Otros AON preferidos según la invención, son aquellos en los que el oligonucleótido incluye no más de una CpG (Citosina y Guanina unidas por fosfato (p)) y/o el oligonucleótido tiene una longitud de entre 16 y 24 nucleótidos, tal como de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos aún más preferentemente menos de 23 nucleótidos, aún más preferentemente entre 16 y 23 nucleótidos, tal como 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 nucleótidos. Según la mayoría de las realizaciones preferidas de la invención, los oligonucleótidos se caracterizan porque tienen ambas propiedades (a) como máximo dos secuencias de CpG, preferentemente no más de una, tal como una CpG y (b) una longitud de entre 16 y 24 nucleótidos, tal como 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos, aún más preferentemente menos de 23 nucleótidos, aún más preferentemente entre 16 y 23 nucleótidos, tal como 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 nucleótidos.

Una característica adicional opcional de los AON según la invención es que su secuencia carece de un tramo de 3 o más guanosinas consecutivas.

Los AON preferidos específicos de la invención tienen las secuencias de nucleótidos AON1, AON2, AON3, AON4, AON20, AON21, AON22, AON23, AON24, AON24.1, AON24.2, AON24.3, AON24.3, AON.24.4, AON.24.5, AON25 y mh-AON1 como se desvela en la Tabla 1 anterior. Más preferentemente para estos oligos, todos los residuos de ribosa están 2'-O-metilados y sustancialmente todos los enlaces internucleosídicos son enlaces de fosforotioato.

En todas las realizaciones de la presente invención, los términos "*impedir, o al menos reducir, inclusión de exón*" y "*omisión de exón*" son sinónimos. Con respecto a "*impedir, o al menos reducir, la inclusión de exón*" o "*la omisión de exón*", en COL7A1, debe interpretarse como la exclusión del exón 73 (SEQ ID NO: 1, o de sus formas alélicas) del ARNm de COL7A1 humano (véase la figura 1). En el presente documento, la expresión *omisión de exón* se define como la inducción, en una célula, de un ARNm maduro que no contiene un exón particular que estaría presente en el ARNm maduro sin omisión de exón. La omisión de exón se realiza, proporcionando a una célula que expresa el pre-ARNm de dicho ARNm maduro, una molécula que sea capaz de interferir con secuencias tales como, por ejemplo, la secuencia donadora o aceptora de corte y empalme necesaria para permitir el proceso bioquímico de corte y empalme, o una molécula que sea capaz de interferir con una señal de inclusión de exón necesaria para el reconocimiento de un tramo de nucleótidos para que se incluya como un exón en el ARNm maduro; en el presente documento dichas moléculas se denominan *moléculas de omisión de exón*.

La expresión *pre-ARNm* se refiere a un ARNm precursor no procesado o parcialmente procesado que se sintetiza en una célula por transcripción a partir de un molde de ADN.

La expresión "*oligonucleótido antisentido*" se entiende que se refiere a una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos diana en una molécula de pre-ARNm, ARNhn (ARN heterogéneo nuclear) o ARNm, de tal manera que puede emparejarse con su secuencia diana correspondiente.

El término "complementaria", como se usa en el presente documento, incluye "completamente complementaria" y "sustancialmente complementaria", lo que significa que, entre el oligonucleótido y su secuencia diana correspondiente, normalmente habrá un grado de complementariedad mayor de 80 %, preferentemente mayor de 85 %, aún más preferentemente mayor de 90 %, lo más preferentemente mayor de 95 %. Por ejemplo, para un oligonucleótido de 20 nucleótidos de longitud, con un emparejamiento erróneo entre su secuencia y su secuencia diana, el grado de complementariedad es de 95 %.

El grado de complementariedad de la secuencia antisentido es preferentemente tal que, en condiciones fisiológicas, una molécula que comprende la secuencia antisentido, puede emparejarse con la secuencia de nucleótidos diana en la molécula de ARN, facilitando así la omisión de exón. Como bien sabe el experto familiarizado en la materia, determinados emparejamiento erróneos son más permisibles que otros, porque determinados emparejamientos erróneos tienen menos efecto que otros sobre la intensidad de unión, expresada en cuanto a temperatura de fusión o T<sub>f</sub>, entre el AON y la secuencia diana. Determinados pares de bases no complementarios, pueden formar las denominadas "oscilaciones" que interrumpen la unión general a un menor grado que los verdaderos emparejamientos erróneos. La longitud del AON también juega un papel en la intensidad de unión, como norma, los AON más largos tienen temperaturas de fusión más elevadas que las de los AON más cortos, y el contenido de G/C de un oligonucleótido también es un factor que determina la intensidad de unión, cuanto mayor es el contenido de G/C, mayor es la temperatura de fusión para cualquier longitud dada. Determinadas modificaciones químicas de las nucleobases o de la cadena principal de azúcar-fosfato, contempladas en la presente invención, también puede influir en la intensidad de unión, de tal manera que el grado de complementariedad es solo un factor a tener en cuenta al diseñar un oligonucleótido según la invención.

La presencia de una CpG o multitud (dos o más) de CpG en un oligonucleótido se asocia generalmente con una mayor inmunogenicidad de dicho oligonucleótido (Dorn y Kippenberger, 2008). Este aumento de la inmunogenicidad no es

deseado, ya que puede inducir daños en el tejido a tratar, es decir, en la piel (dermis y/o epidermis).

La invención permite diseñar un oligonucleótido con parámetros cinéticos de unión a ARN y/o propiedades termodinámicas aceptables. Los parámetros cinéticos de unión al ARN y/o las propiedades termodinámicas están determinados, al menos en parte, por la temperatura de fusión de un oligonucleótido (T<sub>f</sub>; calculada con la calculadora de propiedades de oligonucleótidos ([www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html](http://www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html)) para ARN monocatenario utilizando la T<sub>f</sub> básica y los modelos de los vecinos más cercanos (en inglés *nearest neighbor*)), y/o la energía libre del complejo exón AON-diana (utilizando la estructura de ARN versión 4.5). Si una T<sub>f</sub> es demasiado alta, se espera que el oligonucleótido sea menos específico. Una T<sub>f</sub> y energía libre aceptables dependen de la secuencia del oligonucleótido, de las propiedades químicas de la cadena principal (fosfodiéster, fosforotioato, fosforamidoato, ácidos peptidonucleicos, etc.), de la naturaleza del residuo de azúcar (ribosa, desoxirribosa, ribosa sustituida, puente intramolecular) y de las modificaciones químicas de las nucleobases. Por lo tanto, el intervalo de la T<sub>f</sub> puede variar en gran medida.

Según un aspecto de la invención, a través de *micro-walking* de la región 5' del exón 73 con los AON, se proporcionan nuevos AON según la invención. Por tanto, se ha identificado un nuevo motivo de 8 nucleótidos (un supuesto ESE) que forma una diana adecuada para diseñar los AON según la invención.

La longitud del oligo seleccionado por los presentes inventores variaba entre 16 y 24 nucleótidos, pero también es posible una longitud diferente. Se prefiere que tenga una longitud que sea lo suficientemente larga como para permitir una interacción estable con el ARN diana y especificidad por la secuencia diana, pero no más de lo necesario, ya que los oligonucleótidos más largos son más costosos de fabricar y son más complejos desde un punto de vista analítico. La eficacia de la región 5' del exón 73 de las moléculas de omisión de exón puede someterse a ensayo, preparando una serie de oligonucleótidos solapantes cuya eficacia de omisión de exón se analiza en un ensayo *in vitro*, como se ilustra en los ejemplos. Los AON que establecen una eficacia satisfactoria de omisión de exón, se seleccionan después en función de la capacidad de fabricación, la inmunogenicidad y otros criterios de utilizabilidad proporcionados en el presente documento.

La estrategia opuesta también es posible. Según esta estrategia, los oligo se diseñan primero en función de la capacidad de fabricación, la inmunogenicidad y otros criterios de utilizabilidad proporcionados en la presente invención, y después la eficacia de omisión de exón se somete a ensayo. Una actividad funcional de dicho oligonucleótido es inducir, preferentemente, la omisión del exón 73 (SEQ ID NO: 1) hasta cierto grado y/o al menos disminuir la producción de un ARNm que contenga el exón 73, aumentando así la producción de una proteína de colágeno más corta que la de tipo silvestre pero funcional.

El porcentaje o la eficacia de omisión de exón puede calcularse determinando la concentración de la banda de tipo silvestre amplificada, dividida entre la concentración de la banda acortada (sin exón 73) amplificada, después de un número dado de ciclos de PCR, multiplicado por 100 %, para cualquier conjunto de cebadores dado, siempre que el número de ciclos sea tal que la amplificación esté todavía en la fase exponencial. La cuantificación puede realizarse utilizando el equipo Bioanalyzer DNA1000

Los AON preferidos según la invención son aquellos que muestran un porcentaje de omisión mayor de 70 % en las células tratadas con AON en comparación con las células no tratadas, más preferentemente mayor de 80 %, aún más preferentemente mayor de 90 %, medido mediante análisis RT-PCR (PCR en tiempo real).

Preferentemente, un AON según la invención, que comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1, es tal que la parte complementaria es al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, aún más preferentemente al menos 95 %, a lo sumo 100 % complementaria a la secuencia diana. Por tanto, no es absolutamente necesario que en la región de complementariedad todas las bases tengan que emparejarse con bases en la cadena opuesta. Por ejemplo, cuando se diseña el oligonucleótido, se puede querer incorporar, por ejemplo, un resto que no forme un par de bases con la base de la cadena complementaria. En cierta medida, si en las circunstancias en las que se encuentra la célula, el tramo de nucleótidos es suficientemente capaz de hibridarse con la parte complementaria, pueden permitirse los emparejamientos erróneos. En este contexto, "*suficientemente*" significa que los AON según la invención son capaces de inducir la omisión de exón del exón 73. La omisión del exón diana puede evaluarse convenientemente mediante RT-PCR. Las regiones complementarias se diseñan preferentemente de manera que, cuando se combinan, son específicas para el exón en el pre-ARNm. Dicha especificidad puede crearse con regiones complementarias de diversa longitud, ya que depende de las secuencias reales en otras moléculas de (pre-)ARNm del sistema. El riesgo de que el oligonucleótido también pueda hibridarse con una o más moléculas de pre-ARNm disminuye al aumentar el tamaño del oligonucleótido, mientras que la longitud no debe ser demasiado larga para crear problemas relacionados con la capacidad de fabricación, purificación y/o análisis.

Está claro que los oligonucleótidos que comprenden emparejamientos erróneos en la región de complementariedad, pero que conservan la capacidad de hibridarse y/o unirse a la región (o regiones) diana en el pre-ARNm, pueden utilizarse en la presente invención. Sin embargo, preferentemente al menos las partes complementarias no comprenden dichos emparejamientos erróneos ya que estos normalmente tienen una mayor eficacia y especificidad, que la de los oligonucleótidos que tienen dichos emparejamientos erróneos en una o más regiones complementarias. Se piensa, que una mayor intensidad de hibridación, (es decir, un mayor número de interacciones con la cadena

opuesta), es favorable para aumentar la eficacia del proceso de interferencia con la maquinaria de corte y empalme del sistema. Preferentemente, la complementariedad varía del 90 % al 100 %. En general, en un oligonucleótido de 20 nucleótidos, esto permite 1 o 2 emparejamientos erróneos.

5 Una molécula de omisión de exón de la invención es preferentemente un oligonucleótido (antisentido), que es complementario a la SEQ ID NO: 1.

Preferentemente, la longitud de la parte complementaria del oligonucleótido es la misma que la del oligonucleótido, lo que significa que no hay extremos 5' o 3' del oligo que no formen un par de bases con el ARN diana. Por tanto, la longitud de un oligonucleótido de la invención varía entre 16 y 24 nucleótidos, por ejemplo, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos.

10 Una molécula de omisión de exón según la invención, puede contener uno o más restos de ADN (en consecuencia, un resto "u" de ARN será un resto "t" como parte complementaria de ADN), o uno o más restos de ARN, y/o uno o más análogos de nucleótidos o equivalentes, como se detallará más adelante en el presente documento. Las SEQ ID NO: 5-35 y 39-43 son secuencias de ARN, pero la invención también incluye cada una de estas secuencias en forma de ADN, y también híbridos de ADN/ARN de estas secuencias.

15 Se prefiere que una molécula de omisión de exón de la invención comprenda uno o más restos que se modifiquen para aumentar la resistencia a nucleasas y/o aumentar la afinidad del oligonucleótido antisentido por la secuencia diana. Por lo tanto, en una realización preferida, la secuencia de nucleótidos antisentido comprende al menos un análogo de nucleótido o equivalente, en donde un análogo de nucleótido o equivalente se define como un resto que tiene una base modificada, y/o una cadena principal modificada, y/o un enlace internucleosídico no natural, o una combinación de estas modificaciones.

20 En una realización preferida, el análogo de nucleótido o equivalente comprende una cadena principal modificada. Como ejemplos de dichas cadenas principales se proporcionan cadenas principales de morfolino, cadenas principales de carbamato, cadenas principales de siloxano, cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona, cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo, cadenas principales de metilformacetilo, cadenas principales de riboacetilo, cadenas principales que contienen alqueno, cadenas principales de sulfamato, sulfonato y sulfonamida, cadenas principales de metilnimina y metilhidrazina y cadenas principales de amida. Los oligómeros de morfolino fosforodiamidato son oligonucleótidos con cadena principal modificada que anteriormente se han investigado como agentes antisentido. Los oligonucleótidos de morfolino tienen una cadena principal sin carga en la que el azúcar desoxirribosa del ADN se reemplaza por un anillo de seis miembros y el enlace fosfodiéster se reemplaza por un enlace fosforodiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino son resistentes a la degradación enzimática y parecen funcionar como agentes antisentido al detener la traducción o interferir con el corte y empalme del pre-ARNm en lugar de activar la RNasa H. Los oligonucleótidos de morfolino se han suministrado con éxito a células de cultivo tisular mediante procedimientos que alteran físicamente la membrana celular y un estudio en el que se compararon varios de estos procedimientos, se descubrió que la carga por raspado era el procedimiento de suministro más eficaz; sin embargo, como la cadena principal de morfolino no tiene carga, los lípidos catiónicos no son mediadores eficaces de la absorción de oligonucleótidos de morfolino en las células.

30 Según una realización de la invención, en una cadena principal el enlace entre los restos no incluye un átomo de fósforo, tal como un enlace que se forma por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta.

35 Según esta realización, un análogo o equivalente de nucleótido preferido comprende un ácido peptidonucleico (APN), que tiene una cadena principal de poliamida modificada (Nielsen, y col., (1991) Science 254,1497-1500). Las moléculas basadas en APN son verdaderas imitaciones de moléculas de ADN en cuanto a reconocimiento de pares de bases. La cadena principal del APN se compone de unidades de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos, en la que las nucleobases están unidas a la cadena principal por enlaces metilencarbonilo. Una cadena principal alternativa comprende un monómero de APN de pirrolidina extendido con un carbono (Chevindaraju y Kumar (2005) Chem. Commun, 495-497). Como la cadena principal de una molécula de APN no contiene grupos fosfato cargados, los híbridos de APN-ARN suelen ser más estables que los híbridos de ARN-ARN o ARN-ADN, respectivamente (Egholm y col., (1993) Nature 365, 566-568).

50 Según otra realización de la invención, la cadena principal comprende un análogo de nucleótido morfolino o equivalente, en el que el azúcar ribosa o desoxirribosa se reemplaza por un anillo de morfolino de 6 miembros. Un análogo de nucleótido o equivalente más preferido comprende un oligómero de morfolino fosforodiamidato (OMP), en el que el azúcar ribosa o desoxirribosa se reemplaza por un anillo morfolino de 6 miembros, y el enlace fosfodiéster aniónico entre los anillos morfolino adyacentes se reemplaza por un enlace fosforodiamidato no iónico.

55 En otra realización adicional, un análogo de nucleótido o equivalente de la invención comprende una sustitución de uno de los oxígenos no puente en el enlace fosfodiéster. Esta modificación desestabiliza ligeramente la formación de pares de bases aunque añade resistencia significativa a la degradación por nucleasas. Un análogo de nucleótido o equivalente preferido comprende fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfortriester,



aminoalquilfosfotriéster, H-fosfonato, metil y otros alquilfosfonato, incluido 3'-alquilenfosfonato, 5'-alquilenfosfonato y fosfonato quiral, fosfinato, fosforamidato incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidato, tionofosforamidato, tioalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriéster, selenofosfato o boranofosfato.

5 Un análogo de nucleótido o equivalente preferido adicional de la invención, comprende uno o más residuos de azúcar que están mono o disustituidos en la posición 2', 3' y/o 5' tal como un -OH; -F; alquilo, alquenoilo, alquinilo, alcarilo, alilo o aralquilo (C1-C10) inferior, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenoilo; O-, S- o N-alquinilo; O-, S- o N-alilo; O-alquil-O-alquilo, -metoxi, -aminopropoxi; metoxietoxi; -dimetilaminooxietoxi; y -dimetilaminoetoxietoxi. El residuo de azúcar puede ser una furanosa o un derivado de la misma, o una desoxifuranosa o un derivado de la misma, preferentemente ribosa o un derivado de la misma, o desoxirribosa o un derivado de la misma. Un residuo de azúcar derivatizado preferido  
10 comprende un ácido nucleico bloqueado (ANB), en el que el átomo de carbono 2' está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando así un residuo de azúcar bicíclico. Un ANB preferido comprende ácido nucleico puenteado con 2'-O,4'-C-etileno (Morita y col., 2001. Nucleic Acid Res Supplement No. 1: 241-242). Estas sustituciones hacen que el análogo de nucleótido o equivalente sea resistente a RNasa H y nucleasa y aumentan la afinidad por el ARN diana.  
15

Un experto en la materia sabe que en un oligonucleótido antisentido no es necesario modificar todos los enlaces internucleosídicos. Por ejemplo, algunos enlaces internucleosídicos pueden estar sin modificar, mientras que otros enlaces internucleosídicos están modificados. Todos los AON que comprenden una cadena principal que consiste en una forma de enlaces internucleosídicos (modificados), múltiples formas de enlaces internucleosídicos (modificados),  
20 distribuidos de uniformemente o no uniformemente en toda la longitud del AON, están incluidos en la presente invención. Además, cualquier modalidad de modificación de la cadena principal (uniforme, no uniforme, monoforme o pluriforme y todas sus permutaciones) puede combinarse con cualquier forma o de modificaciones del azúcar o de los nucleósidos o análogos que se mencionan a continuación.

Una cadena principal especialmente preferida para los AON según la invención es una cadena principal uniforme (toda) de fosfortioato (PS).  
25

En otra realización, un análogo de nucleótido o equivalente de la invención comprende una o más modificaciones o sustituciones de bases. Las bases modificadas comprenden bases sintéticas y naturales tales como inosina, xantina, hipoxantina y otros derivados -aza, deaza -hidroxi, -halo, -tio, -tiol, -alquilo, -alquenoilo, -alquinilo, tioalquilo de bases de pirimidina y purina que son o serán conocidas en la técnica.

30 Un experto en la materia sabe que no es necesario que en un oligonucleótido antisentido se modifiquen uniformemente todas las posiciones. Además, se pueden incorporar más de uno de los análogos o equivalentes mencionados anteriormente en un solo oligonucleótido antisentido o incluso en una sola posición dentro de un oligonucleótido antisentido. En determinadas realizaciones, un oligonucleótido antisentido de la invención tiene al menos dos tipos diferentes de análogos o equivalentes.

35 Según otra realización, los AON según la invención comprenden un oligonucleótido antisentido 2'-O alquilo (preferentemente inferior) fosfortioato, tal como 2'-O-metil ribosa modificada (ARN), 2'-O-metoxietil ribosa modificada, 2'-O-etil ribosa modificada, 2'-O-propil ribosa modificada y/o derivados sustituidos de estas modificaciones, tales como derivados halogenados.

40 Un formato de oligonucleótido antisentido eficaz y preferido según la invención, comprende residuos de 2'-O-metil ribosa modificados con una cadena principal de fosfortioato, preferentemente en el que sustancialmente todos los residuos de ribosa están 2'-O-metilados y sustancialmente todos los enlaces internucleosídicos son enlaces de fosfortioato.

Un experto en la materia también sabrá que se pueden combinar diferentes oligonucleótidos antisentido para omitir eficazmente el exón 73 del gen COL7A1. En un procedimiento de la invención puede utilizarse una combinación de  
45 dos oligonucleótidos antisentido, tal como dos oligonucleótidos antisentido, tres oligonucleótidos antisentido diferentes, cuatro oligonucleótidos antisentido diferentes, o cinco oligonucleótidos antisentido diferentes dirigidos a la misma región o a regiones diferentes del exón 73 (figura 1), siempre que al menos un AON sea uno según la invención.

Un oligonucleótido antisentido puede unirse a un residuo que mejora la absorción del oligonucleótido antisentido en las células, preferentemente células de la piel. Son ejemplos de dichos residuos los colesterolos, hidratos de carbono,  
50 vitaminas, biotina, lípidos, fosfolípidos, péptidos que se introducen en las células, incluidos, entre otros, antennapedia, TAT, transportano y aminoácidos con carga positiva tales como oligoarginina, poliarginina, oligolisina o polilisina, dominios de unión a antígeno tales como los proporcionados por un anticuerpo, un fragmento Fab de un anticuerpo, o un dominio de unión a antígeno de una sola cadena tal como un dominio de unión a antígeno de un solo dominio de camélido.

55 Una molécula de omisión de exón según la invención puede ser un oligonucleótido antisentido desnudo (gimnótico) o en forma de un conjugado o expresado a partir de un vector (AON vectorizado). La molécula de omisión de exón puede administrarse utilizando medios adecuados conocidos en la técnica. Cuando la molécula de omisión de exón es un AON vectorial, éste puede proporcionarse, por ejemplo, a un individuo o a una célula, tejido u órgano de dicho

individuo, en forma de un vector de expresión en el que el vector de expresión codifica una transcrito que comprende dicho oligonucleótido. Preferentemente, el vector de expresión se introduce en una célula, tejido, órgano o individuo, a través de un vehículo de suministro de genes, tal como un vector vírico. En una realización preferida, se proporciona un vector de expresión basado en virus que comprende un casete de expresión o un casete de transcripción que impulsa la expresión o transcripción de una molécula de omisión de exón como se identifica en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención proporciona un vector vírico que expresa una molécula de omisión de exón según la invención cuando se coloca en condiciones que conducen a la expresión de la molécula de omisión de exón. Una célula puede estar provista de una molécula de omisión de exón capaz de interferir con secuencias esenciales para la inclusión del exón 73, o al menos que conduzcan a la inclusión del mismo, de tal manera que dicha interferencia impida, o al menos reduzca, la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1, por ejemplo, mediante expresión de oligonucleótidos antisentido procedentes de plásmidos o expresión vírica proporcionada por vectores basados en adenovirus o en virus adenoasociados. La expresión puede dirigirla un promotor de polimerasa III, tal como un promotor U1, U6 o U7 de ARN. Un vehículo de suministro preferido es un vector vírico, tal como un vector vírico adenoasociado (AAV, *adeno-associated virus*), o un vector retrovírico, tal como un vector lentivírico y similares. Asimismo, para el suministro de un oligonucleótido como se define en el presente documento, pueden aplicarse adecuadamente plásmidos, cromosomas artificiales, plásmidos utilizables para la recombinación homóloga y la integración dirigida en el genoma de células de mamífero (preferentemente de ser humano). Los vectores preferidos para la presente invención, son aquellos en los que la transcripción es dirigida por promotores de PolIII, y/o en los que los transcritos están en forma de fusiones con los transcritos U1 o U7, que producen buenos resultados para suministrar pequeños transcritos. El experto en la materia sabe cómo diseñar transcritos adecuados. Se prefieren transcritos dirigidos por PolIII. Preferentemente, en forma de un transcripto de fusión con un transcripto U1 o U7. Dichas fusiones pueden generarse como se describe en la técnica (véase, por ejemplo: Gorman L y col., 1998 o Suter D y col., 1999).

Un sistema de expresión de oligonucleótidos antisentido preferido es un vector basado en virus adenoasociado (AAV). Se han desarrollado vectores basados en AAV de cadena sencilla y de cadena doble, que pueden utilizarse para la expresión prolongada de secuencias de nucleótidos antisentido para la omisión altamente eficaz del exón 73 de COL7A1.

Un vector basado en AAV preferido, por ejemplo, comprende un casete de expresión que es dirigido por un promotor de polimerasa III (Pol III). Un promotor preferido de Pol III es, por ejemplo, un promotor de ARN de U1, U6 o U7.

También se desvela un vector basado en virus, que comprende un casete de expresión dirigido por el promotor Pol III para la expresión de un oligonucleótido antisentido de la invención para inducir la omisión del exón 73 de COL7A1.

Un vector de AAV desvelado en el presente documento, es un vector de AAV recombinante y se refiere a un vector de AAV que comprende parte de un genoma de AAV que comprende una molécula de omisión de exón codificada según la invención, encapsidada en una cubierta proteica de la proteína capsidial procedente de un serotipo de AAV, como se representa en otra parte del presente documento. Parte de un genoma de AAV puede contener las repeticiones terminales invertidas (RTI) procedentes de un serotipo de virus adenoasociado, tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9 y otros. La cubierta proteica que comprende la proteína de la cápside puede proceder de un serotipo de AAV tal como AAV1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 y otros. Una cubierta proteica también puede recibir el nombre de cubierta proteica capsidial. El vector de AAV puede tener uno o preferentemente todos los genes de AAV de tipo silvestre deletados, pero aún puede comprender secuencias de ácido nucleico de RTI funcionales. Las secuencias de RTI funcionales son necesarias para la replicación, el rescate y el empaquetamiento de viriones de AAV. Las secuencias de RTI pueden ser secuencias de tipo silvestre o pueden tener una identidad de secuencia de al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 o 100 % con secuencias de tipo silvestre o pueden alterarse, por ejemplo, mediante inserción, mutación, delección o sustitución de nucleótidos, siempre y cuando sigan siendo funcionales. En este contexto, la funcionalidad se refiere a la capacidad de dirigir el empaquetamiento del genoma en la cubierta de la cápside y después permitir la expresión en la célula hospedadora que se va a infectar o en la célula diana. En el contexto de la presente invención, una cubierta proteica capsidial puede ser de un serotipo diferente al del genoma de RTI del vector de AAV. Un vector de AAV según la presente invención, puede estar compuesto por una cubierta proteica capsidial, es decir, de la cápside icosaédrica, que comprende proteínas capsidiales (VP1, VP2 y/o VP3) de un serotipo de AAV, por ejemplo, serotipo 2 de AAV, mientras que las secuencias de RTI contenidas en ese vector de AAV5 pueden ser cualquiera de los serotipos de AAV descritos anteriormente, incluyendo un vector de AAV2. Por lo tanto, un "vector de AAV2" comprende una cubierta proteica capsidial del serotipo 2 de AAV, mientras que, por ejemplo, un "vector de AAV5" comprende una cubierta proteica capsidial del serotipo 5 de AAV, por lo que cualquiera de los dos puede encapsidar cualquier genoma de RTI del vector de AAV según la invención.

Preferentemente, un vector de AAV recombinante desvelado en el presente documento, comprende una cubierta proteica capsidial de AAV de serotipo 2, 5, 8 o serotipo 9 de AAV en el que el genoma o las RTI de AAV presentes en dicho vector de AAV proceden del serotipo 2, 5, 8 o serotipo 9 de AAV; dicho vector de AAV se denomina AAV2/2, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9, AAV5/2, AAV5/5, AAV5/8, AAV 5/9, AAV8/2, AAV 8/5, AAV8/8, AAV8/9, AAV9/2, AAV9/5, AAV9/8 o vector AAV9/9, respectivamente.

Más preferentemente, un vector de AAV recombinante desvelado en el presente documento, tiene tropismo por células dérmicas y epidérmicas y comprende una cubierta proteica capsidial de AAV de serotipo 5 u 8. El genoma del vector

de AAV o las RTI presentes en dicho vector, pueden proceder del mismo serotipo o de un serotipo diferente, tal como del serotipo 2 de AAV; dicho vector se denomina vector de AAV 2/5 o AAV 2/8. El AAV con una cápside de serotipo 5 tiene tropismo por células dérmicas y epidérmicas, tales como queratinocitos basales y suprabasales y fibroblastos dérmicos. Los vectores de AAV con una cápside de serotipo 5 muestran eficacias de transducción mucho más altas en comparación con vectores de AAV con una cápside de serotipo 2 (Keswani y col., *Wound Repair Regen.* 2012; 20(4): 592-600). De manera similar, el AAV con una cápside de serotipo 8 muestra tropismo hacia fibroblastos dérmicos y (principalmente) queratinocitos suprabasales. Por otra parte, el AAV 2/8 tiende a ser más eficaz en la transducción de células dérmicas y epidérmicas de mamíferos, preferentemente humanas, que el AAV 2/5. Sin embargo, la eficacia de transducción parece depender del momento de la administración durante la cicatrización de la herida, mostrando el AAV 2/2 mayores eficacias de transducción que el AAV 2/5 y AAV 2/8 en momentos posteriores (Keswani y col., citados anteriormente).

Por consiguiente, AAV 2/2, AAV x/5 y AAV x/8 son los AAV preferidos para suministrar los AON según la invención y su elección puede determinarse teniendo en cuenta el tiempo de administración y los tipos de células a los que se dirige. Un experto en la materia puede solucionar fácilmente estos detalles, en estudios preclínicos o clínicos.

Una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de omisión de exón según la presente invención, representada por una secuencia de ácido nucleico de elección, se inserta preferentemente entre el genoma de AAV o las secuencias RTI identificadas anteriormente, por ejemplo, una construcción de expresión que comprende un elemento regulador de expresión unido operativamente a una secuencia codificante y una secuencia de terminación 3'.

Las "funciones auxiliares de AAV" generalmente se refieren a las funciones de AAV correspondientes, necesarias para la replicación y el empaquetamiento de AAV que se proporciona al vector de AAV *en trans*. Las funciones auxiliares de AAV complementan las funciones de AAV que faltan en el vector de AAV, pero carecen de las RTI de AAV (que proporciona el genoma del vector de AAV). Las funciones auxiliares de AAV incluyen los dos ORF (siglas del inglés *open reading frame*, marco abierto de lectura) principales de AAV, en concreto, la región codificante *rep* y la región codificante *cap* o secuencias funcionales sustancialmente idénticas de las mismas. Las regiones Rep y Cap son muy conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Chiorini y col., (1999, *J. of Virology*, Vol 73(2): 1309-1319) o el documento US 5 139 941. Las funciones auxiliares de AAV pueden proporcionarse en una construcción auxiliar de AAV, que puede ser un plásmido. La introducción de la construcción auxiliar en la célula hospedadora puede ocurrir, por ejemplo, por transformación, transfección o transducción antes que, o simultáneamente con, la introducción del genoma de AAV presente en el vector de AAV como se identifica en el presente documento. Por tanto, las construcciones auxiliares de AAV de la invención, pueden elegirse de tal manera que produzcan la combinación deseada de serotipos para la cubierta proteica capsidial del vector de AAV, por un lado, y por otro lado, para el genoma de AAV presente en dicha replicación y empaquetamiento del vector de AAV.

El "virus auxiliar de AAV" proporciona funciones adicionales necesarias para la replicación y empaquetamiento de AAV. Los virus auxiliares de AAV adecuados incluyen adenovirus, virus del herpes simple (tal como VHS tipos 1 y 2) y virus variolovacunales (*vaccinia*). Las funciones adicionales proporcionadas por el virus auxiliar también pueden introducirse en la célula hospedadora a través de vectores, como se describe en el documento US 6 531 456.

Preferentemente, un genoma de AAV, como está presente en un vector de AAV recombinante desvelado en el presente documento, no comprende ninguna secuencia de nucleótidos que codifique proteínas víricas, tales como los genes *rep* (replicación) o *cap* (cápside) genes de AAV. Un genoma de AAV puede comprender además un gen marcador o indicador, tal como un gen que codifique, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos, una proteína fluorescente (por ejemplo, *gfp*) o un gen que codifique un producto detectable y/o seleccionable química, enzimáticamente o de otro modo (por ejemplo, *lacZ*, *aph*, *etc.*) conocido en la técnica.

Un vector de AAV preferido descrito en el presente documento es un vector de AAV, preferentemente un vector AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9 o AAV2/2, que expresa una molécula de omisión de exón según la presente invención que comprende un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: AON1, AON2, AON3, AON4, AON20, AON21, AON22, AON23, AON24, AON24.1, AON24.2, AON24.3, AON24.3, AON.24.4, AON.24.5, AON25 y mh-AON1 como se desvela en la Tabla 1 anterior.

Considerando el progreso que ya se ha logrado hasta ahora, se esperan mejoras en los medios para proporcionar a un individuo o a una célula, tejido y órgano de dicho individuo, una molécula de omisión de exón según la invención. Por supuesto, dichas mejoras futuras pueden incorporarse para lograr el efecto mencionado sobre la reestructuración de ARNm utilizando un procedimiento desvelado en el presente documento. Una molécula de omisión de exón según la invención puede suministrarse tal cual a un individuo, a una célula, tejido u órgano de dicho individuo. Cuando se administra una molécula de omisión de exón según la invención, se prefiere que la molécula se disuelva en una solución que sea compatible con el procedimiento de suministro.

La mayoría de las células absorben fácilmente los AON gimnóticos *in vivo*, y normalmente disolviendo los AON según la invención en una solución (salina) isotónica, será suficiente para alcanzar las células diana, tales como células de la piel (dermis y epidermis). Como alternativa, los AON gimnóticos de la invención, pueden formularse utilizando

excipientes, aditivos, estabilizantes, disolventes, colorantes y similares, farmacéuticamente aceptables. Además, o como alternativa, los AON gimnóticos pueden formularse con cualquiera de los agentes de transfección mencionados más adelante.

5 Las células de la piel (dermis y epidermis) pueden recibir un plásmido para la expresión de oligonucleótidos antisentido proporcionando el plásmido en una solución acuosa, tal como una solución (salina) isotónica. Como alternativa, se puede proporcionar un plásmido mediante transfección utilizando agentes de transfección conocidos.

10 Para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal y/o intradérmica, se prefiere que la solución sea una solución (salina) isotónica. Particularmente preferido es el uso de un excipiente o de agentes de transfección que ayudarán en el suministro de cada uno de los constituyentes, como los definidos en el presente documento, a una célula y/o en el interior de una célula, preferentemente a una célula de la piel (dermis y epidermis). Se prefieren excipientes o agentes de transfección capaces de formar complejos, nanopartículas, micelas, vesículas y/o liposomas, que suministran cada uno de los componentes, como los definidos en el presente documento, formando complejos o atrapados en una vesícula o liposoma a través de una membrana celular. Muchos de estos excipientes son conocidos en la técnica. Los excipientes o agentes de transfección adecuados comprenden polietilenimina (PE1; ExGen500 (MBI Fermentas)), LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) o sus derivados, o polímeros catiónicos similares, incluidos los copolímeros de polipropilenoimina o polietilenimina (PEC) y anfifílicos derivados, sintéticos (SAINT-18), lipofectin™, DOTAP y/o proteínas capsidiales víricas que son capaces de autoensamblarse en partículas que pueden suministrar cada uno de los componentes, como los definidos en el presente documento, a una célula, preferentemente a una célula de la piel (dermis o epidermis). Se ha demostrado que dichos excipientes suministran de manera eficaz un oligonucleótido, tal como ácidos nucleicos antisentido, a una amplia variedad de células cultivadas, incluyendo células de la piel (dermis y epidermis). Su alto potencial de transfección se combina con una toxicidad aceptablemente baja a moderada en cuanto a supervivencia celular global. La facilidad de la modificación estructural puede utilizarse para permitir nuevas modificaciones y el análisis de sus características adicionales de transferencia de ácido nucleico (in vivo) y su toxicidad.

25 La lipofectina representa un ejemplo de un agente de transfección liposomal. Consiste en dos componentes lipídicos, un lípido catiónico, cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil amonio (DOTMA) (cp. DOTAP que es la sal de metilsulfato) y un lípido neutro, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). El componente neutro actúa como mediador en la liberación intracelular. Otro grupo de sistemas de suministro son las nanopartículas poliméricas.

30 Los policationes, tales como dietilaminoetilaminoetilo (DEAE)-dextrano, que son muy conocidos como reactivos de transfección de ADN, pueden combinarse con butilcianoacrilato (PBCA) y hexilcianoacrilato (PHCA) para formular nanopartículas catiónicas que pueden suministrar cada uno de los componentes, como los definidos en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido, a través de las membranas celulares al interior de las células.

35 Además de estos materiales de nanopartículas comunes, la protamina, que es un péptido catiónico, ofrece una estrategia alternativa para formular un oligonucleótido con coloides. Este sistema de nanopartículas coloidales puede formar los denominados protículos, que puede prepararse mediante un sencillo proceso de autoensamblaje para empaquetar y mediar en la liberación intracelular de un oligonucleótido. El experto en la materia puede seleccionar y adaptar cualquiera de los excipientes y sistemas de suministro alternativos anteriores y otros disponibles en el comercio, para empaquetar y suministrar una molécula de omisión de exón para su uso en la presente invención para suministrarla para la prevención, tratamiento o retraso de una enfermedad o afección asociada a un exón 73 mutado en el gen COL7A1.

40 Una molécula de omisión de exón según la invención, podría estar unida de manera covalente o no covalente a un ligando de direccionamiento específicamente diseñado para facilitar la absorción en la célula (especialmente una célula de la piel (dermis)), en el citoplasma y/o en su núcleo. Dicho ligando podría comprender (i) un compuesto (incluidas, pero sin limitación, estructuras peptídicas) que reconozca elementos específicos de células, tejidos u órganos, que faciliten la absorción celular y/o (ii) un compuesto químico capaz de facilitar la absorción en las células y/o la liberación intracelular de un oligonucleótido de las vesículas, por ejemplo, endosomas o lisosomas.

45 Por lo tanto, en una realización preferida, una molécula de omisión de exón según la invención se formula en una composición o un medicamento o en una composición, que está provista de al menos un excipiente y/o un ligando de direccionamiento para el suministro y/o un dispositivo de suministro del mismo a una célula y/o para mejorar su suministro intracelular.

50 El suministro preferido es a través de administración tópica. Como se indica en los ejemplos adjuntos, esto puede hacerse utilizando un hidrogel farmacéuticamente aceptable, tal como Flaminal hydro™, que es un hidrogel que ya se utiliza en asistencia sanitaria, (2) un hidrogel de hipromelosa o (3) un hidrogel de carbómero. Las formulaciones tópicas que pueden utilizarse para el suministro tópico de los oligonucleótidos de la presente invención son:

- 55
- Cremas, formuladas como una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua; siendo estas últimas más aceptables desde el punto de vista cosmético y estético. Son ejemplos las cremas basadas en Softisan o las cremas de cetomacrogol.
  - Geles: Soluciones o suspensiones, que contienen un agente gelificante que se distribuye uniformemente en toda

- la fase líquida. Son ejemplos los hidrogeles que incluyen, pero sin limitación, hipromelosa, carbómero y alginato.
- Pomadas. Generalmente, estas contienen, como vehículo, <20 % de agua y > 50 % de hidrocarburos, ceras o polioles. Tienen una sensación de piel más grasienta que la de las cremas.
  - Pastas: Estas contienen un alto porcentaje de sólidos finamente dispersos con una consistencia rígida.
  - 5 - Suspensiones, que son preparaciones líquidas que contienen partículas sólidas distribuidas en un vehículo líquido. Algunas pueden etiquetarse como lociones.
  - Lociones. Estas son formulaciones fluidas, algo viscosas (emulsión), que comparten muchas características con las suspensiones, los geles de baja viscosidad y las soluciones.
  - Espumas, que son emulsiones que, cuando se distribuyen, tienen una consistencia esponjosa.
  - 10 - Aerosoles, que son pequeñas y finas gotas de líquido, generadas por una boquilla.
  - Soluciones, que son productos líquidos que generalmente son acuosos, pero que puede contener otros disolventes tales como alcoholes.

15 Debe entenderse, que si una composición comprende un componente adicional, tal como un compuesto adjunto definido en el presente documento, cada componente de la composición puede formularse en una sola combinación o composición o preparación. Dependiendo de su identidad, el experto en la materia sabrá qué tipo de formulación es la más apropiada para cada uno de los componentes definidos en el presente documento. En el presente documento también se desvela una composición o una preparación que está en forma de un kit de partes que comprende una molécula de omisión de exón según la invención y un compuesto adjunto adicional como se define en el presente documento.

20 Si se requiere, una molécula de omisión de exón según la invención o un vector, preferentemente un vector vírico, que exprese una molécula de omisión de exón según la invención, puede incorporarse a una mezcla farmacéuticamente activa añadiendo un transportador farmacéuticamente aceptable.

25 Por consiguiente, también se desvela una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende una molécula de omisión de exón según la invención, tal como un AON gimnótico o un vector vírico desvelado en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede comprender una sola molécula de omisión de exón según la invención, pero también puede comprender múltiples moléculas de omisión de exón distintas según la invención. Dicha composición farmacéutica puede comprender cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable, incluyendo un transportador, una carga, un conservante, un adyuvante, un solubilizante y/o un diluyente. Dicho transportador, una carga, conservante, adyuvante, solubilizante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, puede encontrarse, por ejemplo, en Remington, 2000. Cada una de las características de dicha composición se ha definido anteriormente en el presente documento.

30 Si se utilizan múltiples moléculas de omisión de exón distintas según la invención, la concentración o la dosis definida en el presente documento, puede referirse a la concentración o a la dosis total de todos los oligonucleótidos utilizados o a la concentración o a las dosis de cada molécula de omisión de exón utilizada o añadida. Por lo tanto, en una realización, se proporciona una composición en la que cada una, o la cantidad total, de las moléculas de omisión de exón según la invención utilizada, se dosifica en una cantidad que varía entre 0,0001 y 100 mg/kg, preferentemente de 0,001 y 50 mg/kg, aún más preferentemente entre 0,01 y 20 mg/kg.

35 Una molécula de omisión de exón preferida según la invención, es para el tratamiento de la EAD, o, de manera más general, una de enfermedad o afección de un individuo relacionada con el exón 73 mutado de COL7A1. En todas las realizaciones de la presente invención, el término "*tratamiento*" se entiende que incluye la prevención y/o el retraso de la enfermedad o afección. Un individuo, que puede tratarse utilizando una molécula de omisión de exón según la invención, puede que ya se haya diagnosticado que tiene EAD o una enfermedad o afección relacionada con el exón 73 de COL7A1. Como alternativa, un individuo que puede tratarse utilizando una molécula de omisión de exón según la invención, puede que aún no se haya diagnosticado, pero puede ser un individuo con mayor riesgo de desarrollar EAD, o una enfermedad o afección relacionada con el exón 73 de COL7A1 en el futuro, dado su acervo genético. Un individuo preferido es un ser humano. En una realización preferida, la enfermedad o afección relacionada con el exón 73 mutado de COL7A1 es EAD.

40 También se desvela una molécula de omisión de exón según la invención, tal como un AON, o un vector que codifica un AON, tal como un vector vírico, o una composición que comprende un AON, o un vector que codifica un AON, según la invención, para su uso como un medicamento, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de EAD o, de manera más general, una enfermedad o afección de un individuo relacionada con el exón 73 mutado de COL7A1 (como se indicó anteriormente).

45 También se desvela el uso de una molécula de omisión de exón según la invención, tal como un AON, o un vector que codifica un AON, tal como un vector vírico, o una composición que comprende un AON, o un vector que codifica un AON, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de EAD o, de manera más general, una enfermedad o afección de un individuo relacionada con el exón 73 mutado de COL7A1 (como se indicó anteriormente).

55 También se desvela un procedimiento para el tratamiento de un mamífero (preferentemente un humano) que lleva en su genoma una mutación en el exón 73 del gen COL7A1 que causa una enfermedad o trastorno, incluyendo EAD, que comprende administrar al mamífero (ser humano) un AON de la invención, un vector (vírico), o una composición

- 5 farmacéutica que comprende un AON de la invención. Estos pacientes pueden padecer, o estar en riesgo de desarrollar, EAD o un trastorno relacionado. Un trastorno, enfermedad o afección relacionado también incluye, por ejemplo, cáncer de piel (carcinoma epidermoide) u otros carcinomas, que puede surgir como consecuencia de una deficiencia o anomalía de colágeno VII en la piel u en otros órganos de un individuo, causado por, o asociado a, una mutación en el exón 73 del gen COL7A1.
- También se desvelan AON, vectores víricos que codifican los AON, y composiciones farmacéuticas que comprenden los AON según la invención, para su uso como un medicamento para tratar a un mamífero (preferentemente un ser humano) que lleva en su genoma una mutación en el exón 73 del gen COL7A1.
- 10 Las moléculas de omisión de exón según la invención, pueden administrarse a un paciente por vía sistémica, local, tópica, a través de una administración oral, intraocular, intrapulmonar, intranasal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, rectal, por deglución, inyección, inhalación, infusión, pulverización, en forma de soluciones (acuosas), suspensiones, emulsiones (aceite en agua), pomadas, pastillas para chupar, píldoras, etcétera.
- La dosificación puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral, una vez al año, dependiendo de la vía de administración y de la necesidad del paciente.
- 15 Debido a la aparición temprana de la enfermedad, los pacientes que tienen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección causada por, o asociada a, un exón 73 mutado del gen COL7A1, incluyendo EAD, pueden tratarse en el útero, directamente después del nacimiento, a partir de 1, 2, 3, 6 meses de edad, a partir de un año de edad, a partir de los 3 años de edad, a partir de los 5 años de edad, antes o después de la aparición de los síntomas, para aliviar, retrasar el desarrollo, detener o invertir los síntomas de la enfermedad y similares.
- 20 Un tratamiento en un uso o en un procedimiento como se desvela en el presente documento es de al menos una semana, al menos un mes, al menos varios meses, al menos un año, al menos 2, 3, 4, 5, 6 años o crónicamente, incluso durante toda la vida del paciente. Cada molécula de omisión de exón u oligonucleótido de omisión de exón o equivalente del mismo, como se define en el presente documento, para su uso como se desvela en el presente documento, puede ser adecuado para la administración directa a una célula, tejido y/u órgano *in vivo* de individuos ya afectados o en riesgo de desarrollar un trastorno, una enfermedad o afección relacionado con el exón 73 mutado de COL7A1, y puede administrarse directamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La frecuencia de administración de un oligonucleótido, composición, compuesto o compuesto auxiliar de la invención puede depender de varios parámetros, tales como la edad del paciente, la naturaleza de la molécula de omisión de exón (por ejemplo, AON gimnótico o AON vectorizado, tal como AON expresados en vectores de AAV o lentivíricos), la dosis, la formulación de dicha molécula y similares.
- 25 Los intervalos de las dosis de una molécula de omisión de exón, preferentemente un oligonucleótido según la invención, se diseñan preferentemente basándose en estudios de aumento de dosis en ensayos clínicos (uso *in vivo*) para los que existen rigurosos requisitos protocolarios. Un oligonucleótido como se define en el presente documento, puede utilizarse a un intervalo de dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferentemente de 0,01 a 20 mg/kg. La dosis y el régimen de tratamiento pueden variar ampliamente, dependiendo de muchos factores, incluidos, pero sin limitación, la vía de administración (por ejemplo, sistémica frente a tópica), si el oligo se administra como AON gimnótico o como AON vectorizado, el régimen de dosificación, la edad y el peso del paciente, etc.
- 30 En una realización preferida, un vector vírico, preferentemente un vector de AAV como se describe anteriormente en el presente documento, como vehículo de suministro para una molécula según la invención, se administra en una dosis que varía de  $1 \times 10^9$  -  $1 \times 10^{17}$  partículas víricas por inyección, más preferentemente de  $1 \times 10^{10}$  -  $1 \times 10^{14}$ , y lo más preferentemente de  $1 \times 10^{10}$  -  $1 \times 10^{12}$  partículas vírica por inyección.
- 35 Será obvio para un experto habitual en el materia a la que pertenece esta invención, que los detalles del tratamiento deberán establecerse según y dependiendo de factores tales como la secuencia y la química del (de los) oligonucleótido(s), la vía de administración, la formulación, la dosis, el régimen de dosificación, el formato (vector vírico u oligonucleótido gimnótico), la edad y el peso del paciente, la fase de la enfermedad y demás factores, lo que puede requerir investigación clínica y no clínica adicional.
- 40 También se desvela un procedimiento para impedir, o al menos reducir, la inclusión del exón 73 de COL7A1 en una célula que comprende poner en contacto la célula, preferentemente una célula de la piel (fibroblastos dérmicos), con una molécula de omisión de exón según la invención, tal como un AON gimnótico o un vector (vírico) que codifica un AON según la invención, o una composición como se desvela en el presente documento. Las características de este aspecto son, preferentemente, las definidas anteriormente en el presente documento.
- 45 A menos que se indique lo contrario, cada realización, descrita en el presente documento, puede combinarse con otra realización como se describe en el presente documento.
- 50 La capacidad de una molécula de omisión de exón, tal como un AON según la invención, o un vector (vírico) que codifica dicho AON, para prevenir, o al menos reducir, la inclusión del exón 73 mutado de COL7A1, cuando el gen COL7A1 se expresa en una célula de mamífero (preferentemente un ser humano), y se une al pre-ARNm de COL7A1 de mamífero (ser humano) en condiciones fisiológicas en una región que afecta a la selección del aceptor de corte y
- 55

empalme en 5', y de ese modo reduce la inclusión del exón 73 mutado en el ARNm de COL7A1, puede evaluarse convenientemente utilizando los ensayos desvelados en la sección experimental del presente documento. En particular, la molécula de omisión de exón puede incubarse con una célula que contenga el exón 73 (no necesariamente mutado) del gen COL7A1 para evaluar su capacidad para reducir la producción por la célula de ARNm que incluye el exón 73, por ejemplo, por RT-PCR (que puede cuantificarse utilizando un equipo Bioanalyzer), como se describe en el presente documento en la sección experimental y en los ejemplos.

Como puede observarse en la sección experimental y en los ejemplos del presente documento, a nivel de ARN, la adición de varios AON según la invención dirigidos al exón 73 del gen COL7A1 de hecho dio como resultado un ARNm exento de exón 73, lo que conduce a la producción de una proteína de colágeno VII más corta pero funcional.

En los fibroblastos (que pueden proceder de la parte de la dermis de la piel), el colágeno VII se expresa abundantemente. Por lo tanto, cabe esperar que la adición de los AON a fibroblastos cultivados de pacientes con EAD de como resultado una mayor cantidad de proteína de colágeno VII más corta pero funcional que es detectable en una transferencia Western, y como tal, demostrará que la terapia basada en AON no solo redirigirá el corte y empalme del ARNm de COL7A1, sino que también dará como resultado el restablecimiento de la funcionalidad del colágeno VII.

Los términos "adenina", "guanina", "citosina", "timina", "uracilo" e hipoxantina (la nucleobase en la inosina) se refieren a las nucleobases como tales.

Los términos adenosina, guanosina, citidina, timidina, uridina e inosina, se refieren a las nucleobases unidas al azúcar (desoxi)ribosilo.

El término "nucleósido" se refiere a la nucleobase unida al azúcar (desoxi)ribosilo.

En el presente documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para dar a entender que los puntos que siguen a la palabra están incluidos, pero no se excluyen los puntos que no se mencionan específicamente. Además, en referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno(a)" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto precise claramente que haya uno y solo uno de los elementos. Por tanto, el artículo indefinido "un" o "uno(a)" habitualmente significa "al menos uno(a)".

La palabra "incluye" y todos sus tiempos y conjugaciones, debe leerse como "incluye, pero sin limitación".

La palabra "molécula de omisión de exón" significa que incluye AON gimnóticos y AON vectorizados, incluyendo vectores víricos, capaces de expresar los AON en una célula compatible.

La palabra "alrededor de" o "aproximadamente", cuando se utiliza junto con un valor numérico (por ejemplo, aproximadamente 10) significa preferentemente que el valor puede ser el valor dado (de 10) más o menos un 5 % del valor.

La información de secuencia proporcionada en el presente documento no debe interpretarse de manera tan limitada como para requerir la inclusión de bases identificadas erróneamente. El experto en la materia puede identificar dichas bases identificadas erróneamente y sabrá cómo corregir dichos errores. En caso de errores de secuencia, prevalecerá la secuencia del polipéptido obtenible por expresión del gen presente en la SEQ ID NO: 1 que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Análisis de ARNm del exón 73

Para detectar la presencia de ARNm del exón 73 en ARNm de COL7A1, se utilizó ARNm extraído tanto de células HeLa como de fibroblastos humanos primarios (FHP). El cultivo de las células se realizó en (a) medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) complementado con suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) al 10 % para células HeLa, o (b) DMEM AQE complementado con FBS al 20 % y piruvato de sodio al 1 % para células de FHP. Todas las células se cultivaron a una temperatura de 37° C y con CO<sub>2</sub> al 5 %.

Para determinar la eficacia de omisión de exón de los AON descritos, se sembraron células a 60 000 células (HeLa)/pocillo en placas de 12 pocillos o 150 000 células (FHP)/pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas de permitir el crecimiento celular, las células se transfectaron con complejo AON-maxPei 100 nm. El aislamiento de ARN se realizó con el sistema RNA Cell Miniprep de ReliaPrep™ (Promega), posteriormente, el ADNc se creó utilizando el kit Thermo Scientific Verso. Para el exón 73, la PCR se realizó con el cebador FW (*forward*, directo) (5'-GCTGGCATCAAGGCATCT-3'; SEQ ID NO: 51) ubicado en el límite del exón 71-72 y el cebador RV (*reverse*, inverso) (5'-TCCTTTCTCTCCCGTTCTC-3'; SEQ ID NO: 52) ubicado en exón 74. Los productos de PCR se visualizaron con el Bioanalizador utilizando microplacas DNA1000 y para el análisis de la longitud del producto, se utilizó el programa informático Expert 2100.

En la Tabla 2 se muestran eficacias de omisión y en la Figura 3 se muestran resultados de nanolaboratorio. Los AON según la invención, denominados AON1 a AON4, AON20 a AON25 (incluidos los AON 24.1 a 24.5) y m-h AON1,

ES 2 803 651 T3

tienen la mejor eficacia, teniendo > del 70 % de ARNm el exón 73 eliminado. Los AON eficaces se dirigen al extremo 5' del pre-ARNm.

**Tabla 2: Eficacia de la exclusión del exón 73 del ARNm en células HeLa y FHP**

	FHP	HeLa	AON secuencia 5'- 3'	SEQ ID NO	Observaciones
ESE73.3	82 %	96 %	UCUCCACGGUCGCCCCUUCAGCCCGGUUCU	37	
ESE73.7	80 %	73 %	UCUCCACGGUCGCCCCUUCAGCCCGC	38	
AON1	67 %	86 %	UCUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	5	
AON2	69 %	85 %	AGCCCGGUUCUCCAGGAAAGCCGA	6	
AON3	67 %	92 %	GUCGCCCUCAGCCCGGUUCUCA	7	
AON4	91 %	83 %	ACGGUCGCCCCUUCAGCCCGGUU	8	
AON5	10 %	3 %	CCCCUGAGGGCCAGGGUCUCCACGG	9	
AON6	2 %	0 %	CAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCCA	10	
AON7	4 %	0 %	CCAAGGGCCAGACCAGGUGGCCCC	11	
AON8	0 %	0 %	CCAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCC	12	
AON9	0 %	0 %	UCUCCCCAAGGGCCAGACCAGG	13	
AON10	0 %	0 %	GGAAGGCCCGGGGGGCCCCUCUC	14	
AON11	6 %	6 %	CCGGCAAGGCCGGAAGGCCCGGG	15	
AON12	0 %	0 %	AGGCUUUCAGGCUCCCCGGCAAG	16	
AON13	0 %	2 %	CGGGAUACCAGGCUUUCAGGCU	17	
AON14	17 %	25 %	UGCCUGGGAGCCCGGGAUACCA	18	
AON15	8 %	8 %	CCCACACCCCCAGCCUGCCUGGG	19	
AON16	8 %	0 %	CCUCUCCACACCCCCAGCCCU	20	
AON17	9 %	9 %	UCUCUCCUGGCCUUCUGCCUCU	21	
AON18	11 %	13 %	CACCCUCUCUCCUGGCCUCCU	22	
AON19	0 %	7 %	CCAGCCUCACCCUCUCUCCUGG	23	
AON20	74 %	100 %	CUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	24	AON1-1N a 3"
AON21	58 %	89 %	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	25	AON1-2N a 3"
AON22	64 %	85 %	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	26	AON1-3N a 3"
AON23	64 %	83 %	CUCCAGGAAAUCGAUGGGGCCcu	27	AON1-N a 3'+ 1 a 5'
AON24	72 %	93 %	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCCcug	28	AON1-2N a 3 '+ 2 a 5'
AON24.1	32 %	73 %	UCCAGGAAAGCCGAUGGG	39	
AON24.2	50 %	88 %	UCCAGGAAAGCCGAUGG	40	
AON24.3	49 %	79 %	UCCAGGAAAGCCGAUG	41	
AON24.4	53 %	86 %	CUCCAGGAAAGCCGAUGG	42	
AON24.5	66 %	89 %	UCUCCAGGAAAGCCGAUG	43	
AON25	54 %	92 %	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCCcugc	29	AON1-3N a 3'+3 a 5'
AON26	22 %	49 %	AGGAAAGCCGAUGGGGCCcugcag	30	Desplazamiento 2N hacia 5'
AON27	40 %	37 %	GAAAGCCGAUGGGGCCcugcagga	31	Desplazamiento 4N hacia 5'
AON28	20 %	47 %	AAGCCGAUGGGGCCcugcaggagu	32	Desplazamiento 6N hacia 5'
AON29	5 %	0 %	GCCGAUGGGGCCcugcaggagugg	33	Desplazamiento 8N hacia 5'
AON30	6 %	7 %	GAUGGGGCCcugcaggaguggaa	34	Desplazamiento 11N hacia 5'
AON31	0 %	0 %	UCCAGGAAAG	44	
m-HAON 1	76 %	91 %	CGUUCUCCAGGAAAGCCGAUG	35	
m-HAON 2	0 %	16 %	CCUGAGGGCCAGGGUCUCCACG	36	



Dos de los AON que mostraron una eficacia satisfactoria de omisión de exón, se truncaron eliminando un número variable de nucleótidos en el extremo 3' para impedir la aparición de tétradas de G no deseables. Estos AON se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Versiones truncadas de AON24 y AON31

Nombre	Secuencia de los AON	SEQ ID NO	Secuencia de unión a ARN	SEQ ID NO	longitud
AON 24,1	UCCAGGAAAGCCGAUGGG	39	CCCAUCGGCUUCCUGGA	45	18
24,2	UCCAGGAAAGCCGAUGG	40	CCAUCGGCUUCCUGGA	46	17
24,3	UCCAGGAAAGCCGAUG	41	CAUCGGCUUCCUGGA	47	16
24,4	CUCCAGGAAAGCCGAUGG	42	CCAUCGGCUUCCUGGAG	48	18
24,5	UCUCCAGGAAAGCCGAUG	43	CAUCGGCUUCCUGGAGA	49	18
AON 31	UCCAGGAAAG	44	CUUCCUGGA	50	10

- 5 Estos AON redujeron eficazmente la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1 (véase la Tabla 1), a la vez que carecían de cualquier secuencia que fuese menos deseable desde una perspectiva de capacidad de fabricación, purificación y análisis, o la posibilidad de una pérdida general de la función debido a la multiplexación.

La funcionalidad del Colágeno VII sin el exón 73, puede abordarse utilizando varios procedimientos *in vitro* descritos en las referencias bibliográficas:

- 10 1. Análisis de proteínas, tanto el tamaño como el ensamblaje correcto de las cadenas de colágeno  $\alpha 1$ , utilizando transferencia Western (Titeux y col., 2010). Cabe observar que, debido al pequeño tamaño del exón omitido y al gran tamaño de la proteína de tipo silvestre, es posible que no se recoja la diferencia aparente en el tamaño de la proteína.
- 15 2. Análisis de estabilidad térmica del colágeno VII homotrímico, utilizando transferencia Western en condiciones no reductoras. El colágeno VII de tipo silvestre está compuesto por tres cadenas  $\alpha 1$  de colágeno y tiene una Tf de 41° C (Mecklenbeck y col., 2002).
3. Análisis de migración celular utilizando oro coloidal o ensayo de raspado. Compare la motilidad de los fibroblastos y/o los queratinocitos que expresan colágeno VII de tipo silvestre frente a la proteína truncada sin el exón 73 (Chen y col., 2002).
- 20 4. Se puede evaluar la adhesión celular a varios componentes de la matriz extracelular, por ejemplo, a colágeno IV, laminina-332, laminina-1 o fibronectina (Chen y col., 2002).

Los inventores suponen que los AON que demuestran tener el mejor rendimiento en cuanto a impedir, o al menos reducir, la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1 de mamíferos (preferentemente ser humano), proporcionarán resultados satisfactorios en cuanto a funcionalidad del colágeno VII, como puede evaluarse fácilmente utilizando los procedimientos anteriores de la técnica anterior. Por otra parte, los AON que comprenden no más de dos (preferentemente no más de una, tal como una) CpG, funcionarán satisfactoriamente en cuanto a inmunogenicidad *in vivo*. Por consiguiente, los AON más preferidos de la invención son candidatos para el desarrollo en opciones terapéuticas, adecuados para la terapia en seres humanos que padecen o que están en riesgo de padecer, formas de epidermolísis ampollosa distrófica asociadas a mutaciones en el exón 73 del gen COL7A1.

### 30 **Ejemplo 2: Suministro tópico de mh-AON1 utilizando un modelo de piel porcina ex vivo**

El tratamiento actual de las heridas de los pacientes con EAD se centra principalmente en el cuidado de heridas, tratamiento del picor y el dolor y el diagnóstico temprano del carcinoma epidermoide. El cuidado de las heridas incluye la limpieza y esterilización de las heridas por medio de baños (de cloruro), el uso de clorhexidina como desinfectante y otras cremas antimicrobianas. Además, para reducir el dolor y el picor, las heridas se hidratan y humedecen utilizando hidrogeles. Finalmente, el cuidado de las heridas consiste en vendar con diferentes tipos de apósitos/espumas de silicona para proteger y reducir la fricción con la piel, impedir la contaminación, impedir que el material se adhiera, absorber el líquido de las heridas, para impedir que las ampollas crezcan de tamaño, las ampollas se perforan y se drenan para disminuir la presión desde el interior.

- El suministro tópico de mh-AON1 proporciona un par de ventajas, en primer lugar debido al suministro local, habrá suministro directo a las células, queratinocitos y fibroblastos diana. En segundo lugar, debido a la administración local, la absorción sistémica solo será minoritaria, dando como resultado una menor toxicidad sistémica (Wraight & White Pharmacol Ther abril de 2001; 90(1):89-104). Finalmente, se ha demostrado que después de la administración tópica de oligonucleótidos, las concentraciones locales en la dermis y la epidermis pueden llegar a ser hasta 150 (para la dermis) y 4 000 (para la epidermis) veces más altas que después de la administración sistémica (Metha y col., J Invest Dermatol. noviembre de 2000; 115(5):805-12).

Para investigar el suministro tópico de mh-AON1 se estableció un modelo interno de piel porcina *ex vivo*. Se considera

que la piel porcina es muy similar a la piel humana, con el mismo espesor epidérmico y las mismas propiedades de barrera del estrato córneo. Para los estudios de suministro, se recibió piel porcina *ex vivo*, cortada a un espesor entre 0,8 y 1,4 mm y se cultivó en la interfaz aire-líquido con el sitio apical expuesto al aire. En las heridas de pacientes con EAD, la epidermis está completamente separada de la dermis, por lo tanto, estas heridas se imitaron eliminando mecánicamente la epidermis por completo. Para evaluar la introducción de mh-AON1 en piel porcina *ex vivo* intacta o ampollosa, el oligonucleótido se formuló en PBS o en un hidrogel, como parte del cuidado habitual de heridas de EAD. Después de la exposición a mh-AON1, los trazos de piel se fijaron en formalina al 4 %, se procesaron y se embebieron en parafina para la evaluación histológica utilizando hematoxilina como tinción de contraste para determinar la morfología. Dado que el oligonucleótido se conjugó con una etiqueta de Cy5, el sitio de mh-AON1 se pudo visualizar mediante microscopía fluorescente.

#### mh-AON1 formulado en PBS

Los trozos de piel porcina *ex vivo* intacta y ampollosa se incubaron con 25 µg de mh-AON1 formulado en PBS durante 24 horas, después de lo cual se procesaron para su análisis. Los resultados muestran que el mh-AON1 añadido sobre trozos de piel porcina intacta no se introduce en el estrato córneo (Figura 4a-b). Sin embargo, cuando la formulación de mh-AON1 se incubó sobre la piel porcina ampollosa, se observó que el oligonucleótido había penetrado en la dermis (figura 4c-f).

#### mh-AON1 formulado en hidrogeles

Para la aplicación sobre las heridas del paciente, es beneficioso incorporar mh-AON1 en una pomada o gel. Dado que los pacientes con EAD utilizan hidrogeles como parte del cuidado de sus heridas, por ejemplo, para hidratar las heridas y, por lo tanto, disminuir el dolor y el picor, se analizó si el mh-AON1 podría incorporarse también en un hidrogel. Para este fin se utilizaron tres hidrogeles diferentes: (1) flaminol™, que es un hidrogel que ya se utiliza en asistencia sanitaria, (2) un hidrogel de hipromelosa y (3) un hidrogel de carbómero ambos formulados internamente. Todos los hidrogeles ya se utilizan habitualmente en entornos clínicos. Las formulaciones de hidrogel se prepararon con y sin oligonucleótido, y se extendieron sobre los trozos de piel. Para cada trozo de piel, se formularon 25 µg de mh-AON1 en 50 mg de gel, dando una concentración final de 0,5 mg/ml de oligonucleótido.

Se observó que el mh-AON1 formulado en los hidrogeles de flaminol™, hipromelosa o carbómero, nunca podrían introducirse en el estrato córneo intacto de los trozos de piel porcina *ex vivo* (figura 5a, c, e, g). Sin embargo, los tres hidrogeles podrían suministrar el oligonucleótido en la dermis de la piel porcina ampollosa en la que se retiró la epidermis (figura 5b, d, f, h). La optimización de los hidrogeles está en curso y la selección de la formulación final se basará en la profundidad de la introducción en la dermis, la tolerabilidad local, el pH de la combinación mh-AON1, la estabilidad de la formulación de hidrogel mh-AON1 y la liberación del mh-AON1 del hidrogel.

#### Conclusión

Los pacientes con EAD padecen mucho de su frágil piel debido a ampollas, heridas y ulceraciones. Además, necesitan un cuidado constante de las heridas. Por lo tanto, el mh-AON1 se evaluó a través de la vía tópica de suministro. Al eliminar la epidermis, se creó una piel ampollosa, incluyendo el estrato córneo que imita la piel del paciente con EAD. Se demostró que el mh-AON1 formulado en PBS o en un hidrogel es capaz de introducirse en piel ampollosa y que alcanza la dermis. Estos resultados respaldan que la administración tópica a las heridas de la piel del paciente es una estrategia factible para suministrar mh-AON1 a las células diana en la piel. Por otra parte, estos hallazgos confirman que una formulación que se asemeja al cuidado habitual de la EA, parece adecuada en el suministro de mh-AON1.

#### **Ejemplo 3: Pruebas de eficacia a nivel de ARNm**

Para evaluar la eficacia de mh-AON1, se utilizaron dos tipos de células diferentes: (1) HeLa y (2) fibroblastos humanos primarios (FHP) procedentes de piel de individuos sanos. Ambos tipos de células expresan ARNm de COL7A1 y producen la proteína de colágeno tipo VII. El mh-AON1 desvelado en el presente documento se ha diseñado para excluir el exón 73 del ARNm de COL7A1 y, por tanto, excluir mutaciones del transcrito. Dado que el mh-AON1 se dirige al proceso de corte y empalme, el resultado medible más directo de la eficacia es la elaboración de perfiles y la cuantificación de transcritos de COL7A1 (tipo silvestre y Δ73) con y sin la adición de mh-AON1.

#### Elaboración de perfiles y cuantificación del nivel de ARNm de COL7A1 a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una tecnología directa que permite la amplificación logarítmica de una secuencia específica de ADN (ADNc). Para realizar la reacción de PCR, se utilizaron cebadores específicos de secuencia COL7A1, que flanquean al exón 73. Posteriormente, los productos formados se visualizaron utilizando una tecnología de nanolaboratorio que permite la discriminación de los diferentes productos de longitud de los fragmentos y el análisis cuantitativo basado en el rendimiento.

Para los experimentos de omisión del exón 73, se transfectaron células HeLa y FHP con mh-AON1 a una concentración de 100 nM utilizando polietilenimina (Poli I:C) como vehículo de transfección. Las células se recogieron 24 o 40 horas después de la transfección, se aisló todo el ARNm, se sintetizó ADNc y se realizó una PCR utilizando

cebadores específicos de COL7A1, uno en el exón 69 y otro en el exón 74. Como control negativo, se utilizó una versión de secuencia aleatoria (SCRM) del oligonucleótido mh-AON1.

5 Los resultados, determinados mediante PCR, muestran que el tratamiento con mh-AON1 conduce a la exclusión eficaz del exón 73 del ARNm de COL7A1 en comparación con las células tratadas con SCRM (Figura 6). Asimismo, el nivel de ARNm de tipo silvestre en células no tratadas fue comparable al nivel de ARNm de COL7A1 total en células tratadas. Dado que el procedimiento con PCR/bioanalizador es informativo pero no cuantitativo absoluto, se realizó un seguimiento de estos hallazgos iniciales, utilizando ensayos de PCR digital en nanogotas que ofrecen una cuantificación muy precisa y absoluta de los fragmentos de ácido nucleico.

#### Elaboración de perfiles y cuantificación de transcritos de ARNm de COL7A1 con PCR digital en nanogotas

10 La PCR digital en nanogotas (ddPCR) proporciona una cuantificación muy precisa y absoluta de los ácidos nucleicos al dividir la muestra de PCR en miles de gotas. La entrada en la PCR de ARNm/ADNc de COL7A1 se ajustó de tal manera que cada gotita contenía una o ninguna molécula de ADNc de COL7A1. Para permitir la detección del molde, a la mezcla de la PCR se le añadió una sonda específica para COL7A1 de tipo silvestre o  $\Delta 73$ . La ubicación de estas sondas se representa en la Figura 7. Una de las sondas es específica para el producto de tipo silvestre, mientras que  
15 la otra sonda es específica solo para el producto  $\Delta 73$  de COL7A1. Esta sonda al unirse al molde se hidroliza y se vuelve fluorescente, de tal manera que después de realizar la amplificación por PCR, se pueden contar las gotitas fluorescentes que contienen la secuencia diana. Utilizando el análisis estadístico de Poisson de los números de gotas positivas y negativas, se puede calcular la cuantificación absoluta de las moléculas de ARNm de tipo silvestre o  $\Delta 73$  de COL7A1 en la muestra.

20 Las células HeLa se transfectaron con mh-AON1 50, 100 o 200 nM para establecer un perfil de respuesta a la dosis a mh-AON1. Los resultados obtenidos 24 h después de la transfección, muestran que el tratamiento con mh-AON1 produce transcritos de tipo silvestre y transcritos de  $\Delta$  exón 73 de COL7A1. Estos resultados corroboran las observaciones observadas con la PCR. La dosis de 50 nM ya da un efecto casi máximo después de 24 h. Después de 40 h, se observó un pequeño aumento en el % de transcritos de  $\Delta$  exón 73 para la transfección de 50 nM y 200 nM  
25 (Figura 8).

#### **Ejemplo 4: Pruebas de inmunogenicidad in vitro**

Los oligonucleótidos tienen el potencial de causar la activación de receptores de reconocimiento de patrones (RRP) del sistema inmunitario innato de vertebrados. La familia de receptores RRP mejor estudiada son los receptores de tipo Toll (TLR, *toll-like receptors*). Los TLR son una clase de proteínas que juegan un papel clave en el sistema  
30 inmunitario innato. Son receptores únicos, transmembranarios, no catalíticos, que suelen expresarse en macrófagos y células dendríticas que reconocen las moléculas conservadas estructuralmente procedentes de microbios. Los TLR que son activados por diferentes tipos de ácidos nucleicos, son aquellos ubicados en los endosomas: TLR 3 (reconoce ARN bicatenario); TLR7/8 (reconoce ARN bicatenario y monocatenario); y TLR9 (reconoce ADN-CpG).

Después del reconocimiento de estos componentes por los RRP, se desencadena una respuesta inmunitaria 'antimicrobiana' específica. La activación de RRP da como resultado la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de los linfocitos B (NF- $\kappa$ B) activados, del factor 3 regulador de interferón (IRF-3) y de la proteína activadora 1 (AP-1). La activación de AP-1, IRF-3 y NF- $\kappa$ B da como resultado la producción de citocinas inflamatorias, interferones tipo I y otros mediadores de la respuesta inmunitaria innata. Estos procesos no solo desencadenan  
35 respuestas defensivas inmediatas del hospedador, tales como inflamación, sino que también sensibilizan y orquestan respuestas inmunoadaptativas específicas de antígeno.

Para evaluar las respuestas inmunitarias (sistémicas) específicas de fármaco y la inmunotoxicidad, se utilizó exposición *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, siglas del inglés *human peripheral blood mononuclear cells*) primarias a mh-AON1. El ensayo *in vitro* utilizando PBMC es una prueba preclínica establecida que utiliza la producción de citocinas (inflamatorias) como marcador sustituto de las respuestas  
40 inmunitarias sistémicas. El ensayo con PBMC permite predecir la tolerabilidad como un factor del potencial de inmunogenicidad y alergenicidad de los compuestos en investigación, y podría permitir una estimación de un intervalo de dosificación seguro para estos compuestos.

Para los estudios de mh-AON1, se utilizaron PBMC aisladas internas, adquiridas de capas leucoplaquetarias de donantes sanos de bancos de sangre. La producción de las citocinas proinflamatorias clave en el sobrenadante de cultivo se evaluó después de 24 h de estimulación con mh-AON1 a concentraciones que variaban de 10 nM a 1  $\mu$ M. Además, la línea celular indicadora Ramos-Blue (Invivogen, linfocitos B humanos) con integración cromosómica de una construcción indicadora de fosfatasa alcalina embrionaria secretada inducible por NF- $\kappa$ B y/o AP-1, se utilizó para  
50 evaluar la activación inmunitaria mediada por RRP general mediante mh-AON1 y AON73.24.5. Las células Ramos-Blue expresan el conjunto relevante de TLR, que incluye: TLR3, -7/8 y -9. La activación de NF- $\kappa$ B y/o AP-1 se midió después de 24 h de estimulación con mh-AON1 o AON73.25.4 a concentraciones que variaban de 10 nM a 1  $\mu$ M. Por  
55 otra parte, la viabilidad de las PBMC y Ramos-Blue después del tratamiento con mh-AON1, se analizó midiendo la fluorescencia de la resorufina en el sobrenadante de cultivo para evaluar el posible efecto citotóxico de mh-AON1. Las células viables convierten la resazurina no fluorescente en resorufina fluorescente.

Resultados en PBMC humanas

La estimulación de PBMC humanas con los controles positivos LPS (agonista de TLR4) y R848 (agonista de TLR7/8) dio lugar a un aumento significativo de las concentraciones de todas las citocinas medidas, excepto de IL-3, en el sobrenadante de cultivo. Por otra parte, la estimulación con ADN CpG (agonista de TLR9) o poli (I:C) (agonista de TLR3) indujo un patrón similar de citocinas, aunque en menor medida. En la Figura 9a se muestra una matriz cromática que representa los niveles de significación de las concentraciones de citocina en el sobrenadante de cultivo después de la estimulación con mh-AON1 o con los controles positivos en comparación con las PBMC humanas tratadas con solución salina. Cabe destacar que, la estimulación de PBMC humanas con concentraciones de mh-AON1 que varían de 10 nM a 1 µM, no dio como resultado un aumento de las concentraciones de ninguna de las citocinas medidas en el sobrenadante de cultivo, con la excepción de IFN-α2 a la concentración más baja de mh-AON1 (Figura 9a). Sin embargo, dado que el aumento de la concentración de IFN-α2 en el sobrenadante después de la estimulación con mh-AON1 no es dependiente de la dosis se consideró que se trataba de un valor atípico experimental o de un error técnico (Figura 9b). Finalmente, no hubo signos de citotoxicidad 24 h después del tratamiento con mh-AON1 (Figura 9c). En cambio, se observó un ligero aumento de la viabilidad después del tratamiento con R848 o mh-AON1 10 nM y 100 nM, lo que sugiere una mayor supervivencia celular, un aumento del metabolismo celular o incluso un aumento de la proliferación/diferenciación.

Resultados en células Ramos-Blue

Los resultados del ensayo de inmunogenicidad llevados a cabo en la línea celular humana Ramos Blue, no mostraron activación de NF-κB y/o AP-1 después de 24 h de tratamiento con mh-AON1 o AON73.24.5 a concentraciones que variaban de 10 nM a 1 µM (Figura 10a). En cambio, los controles positivos Poli(I:C) (1 µg/ml), CpG (10 µg/ml) y R848 (1 µM), indujeron la activación de NF-κB y/o AP-1. LPS no tuvo efecto, ya que TLR4 no se expresó en células Ramos-Blue. Por otra parte, no hubo signos de citotoxicidad 24 h después del tratamiento con mh-AON1 (Figura 10b) confirmando los resultados obtenidos en las PBMC humanas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PROQR THERAPEUTICS II B.V.  
 <120> EMPAREJAMIENTO DE OLIGONUCLEOTIDOS CON EL EXÓN 73 DE COL7A1 PARA LA TERAPIA DE LA EPIDERMÓLISIS AMPOLLOSA  
 <130> P065922WO  
 <140> PCT/EP2016/\_  
 <141> 11/03/2016  
 <150> GB-1504124.7  
 <151> 11/03/2015  
 <160> 52  
 <170> SeqWin2010, versión 1.0  
 <210> 1  
 <211> 201  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 1  
 ggccccatcg gctttcctgg agaacgcggg ctgaagggcg accgtggaga ccctggccct 60  
 cagggggccac ctggtctggc ctttggggag agggggcccc cggggccttc cggccttgcc 120  
 ggggagcctg gaaagcctgg tattcccggg ctcccaggca gggctggggg tgtgggagag 180  
 gcaggaaggc caggagagag g 201  
 <210> 2  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> *Homo sapiens*  
 <400> 2  
 agcattctct ctccactcc tgcag 25

ES 2 803 651 T3

	<210> 3 <211> 25 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 3 gtgaggctgg gggctggcca ggaga	25
	<210> 4 <211> 8 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 4 uuuccugg	8
	<210> 5 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 5 ucuccaggaa agccgauggg gccc	24
	<210> 6 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 6 agcccgcguu cuccaggaaa gccga	25
	<210> 7 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 7 gucgccuuc agcccgcguu cucca	25
	<210> 8 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 8 acggucgccc uucagccgc guu	23
	<210> 9 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 9	
50	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 9	

# ES 2 803 651 T3

	ccccugaggg ccagggucuc cacgg	25
	<210> 10	
	<211> 25	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 10	
	cagaccaggu ggccccugag ggcca	25
10	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 11	
	ccaagggcca gaccaggugg cccc	24
	<210> 12	
20	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 12	
25	ccagaccagg uggccccuga gggcc 25	
	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 13	
	ucuccccaag ggccagacca gg	22
	<210> 14	
35	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 14	
	ggaaggcccg ggggggcccc ucuc	24
	<210> 15	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 15	
	ccggcaaggc cggaaggccc gggg	24
50	<210> 16	

	<211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 16 aggcuuucca ggcuccccgg caag	24
10	<210> 17 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
15	<400> 17 cgggauuacc aggcuuucca ggcu	24
20	<210> 18 <211> 23 <212> ARN <213> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 18 ugccugggag cccgggaaua cca	23
25	<210> 19 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
30	<400> 19 cccacacccc cagcccugcc uggg	24
35	<210> 20 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 20 ccucuccac acccccagcc cu	22
45	<210> 21 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 21 ucucuccgg ccuuccugcc ucu	23
	<210> 22 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	

# ES 2 803 651 T3

	<400> 22 caccucucu ccuggccuuc cu	22
5	<210> 23 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
10	<400> 23 ccagccucac ccucucuccu gg	22
	<210> 24 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 24 cuccaggaaa gccgaugggg ccc	23
20	<210> 25 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
25	<400> 25 uccaggaaag ccgauggggc cc	22
	<210> 26 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 26 ccaggaaagc cgauggggcc c	21
35	<210> 27 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 27 cuccaggaaa uccgaugggg cccu	24
	<210> 28 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 28 uccaggaaag ccgauggggc ccug	24



	<210> 29	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 29	
	ccaggaaagc cgauggggcc cugc	24
10	<210> 30	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
15	<400> 30	
	aggaaagccg auggggcccu gcag	24
20	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 31	
	gaaagccgau gggggccugc agga	24
25	<210> 32	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 32	
	aagccgaugg ggcccugcag gagu	24
35	<210> 33	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 33	
40	gccgaugggg cccugcagga gugg	24
45	<210> 34	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 34	
	gauggggccc ugcaggagug gaa	23
50	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> ARN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
5	<400> 35 cguucuccag gaaagccgau g	21
	<210> 36	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 36 ccugagggcc agggucucca cg	22
	<210> 37	
15	<211> 30	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 37 ucuccacggu cgcccuucag cccgcuucu	30
	<210> 38	
	<211> 25	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 38 ucuccacggu cgcccuucag cccgc	25
30	<210> 39	
	<211> 18	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 39 uccaggaaag ccgauggg	18
	<210> 40	
40	<211> 17	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
45	<400> 40 uccaggaaag ccgaugg	17
	<210> 41	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 41	
	uccaggaaag ccgaug	16
5	<210> 42 <211> 18 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
10	<400> 42	
	cuccaggaaa gccgaugg	18
	<210> 43 <211> 18 <212> ARN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 43	
	ucuccaggaa agccgaug	18
20	<210> 44 <211> 10 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 44	
	uccaggaaag	10
	<210> 45 <211> 18 <212> ARN	
30	<213> Secuencia de unión a ARN	
	<400> 45	
	cccaucggcu uuccugga	18
	<210> 46 <211> 17 <212> ARN	
35	<213> Secuencia de unión a ARN	
	<400> 46	
	ccaucggcuu uccugga	17
40	<210> 47 <211> 16 <212> ARN <213> Secuencia de unión a ARN	
	<400> 47	
45	caucggcuu ccugga	16
	<210> 48 <211> 18 <212> ARN	
	<213> Secuencia de unión a ARN	
50	<400> 48	
	ccaucggcuu uccuggag	18

# ES 2 803 651 T3

	<210> 49 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia de unión a ARN	
5	<400> 49 caucggcuuu ccuggaga	18
	<210> 50 <211> 10 <212> ARN <213> Secuencia de unión a ARN	
10	<400> 50 cuuuccugga	10
	<210> 51 <211> 18 <212> ADN <213> Cebador	
15	<400> 51 gctggcatca aggcatct	18
	<210> 52 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
25	<400> 52 tccttctct cccgttctc	20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligorribonucleótido antisentido capaz de impedir o reducir la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1 humano, cuando dicho ARNm se produce mediante el corte y empalme de un pre-ARNm en una célula de mamífero, **caracterizado porque** el oligorribonucleótido es capaz de emparejarse con el elemento (ESE/de unión a SRp40/SC35) en el exón 73, **caracterizado por** la secuencia 5'-UUUCCUGG-3' (SEQ ID NO: 4), en el que el oligorribonucleótido tiene una longitud de entre 16 y 24 nucleótidos.
2. Un oligorribonucleótido antisentido según la reivindicación 1, **caracterizado porque** no tiene más de una secuencia de CpG.
- 10 3. Un oligorribonucleótido antisentido capaz de impedir o reducir la inclusión del exón 73 en el ARNm de COL7A1 humano, cuando dicho ARNm se produce mediante el corte y empalme de un pre-ARNm en una célula de mamífero, **caracterizado porque** el oligorribonucleótido se selecciona del grupo que consiste en los oligorribonucleótidos antisentido (AON) de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 35, 39, 40, 41, 42 y 43.
4. Un oligorribonucleótido antisentido según la reivindicación 3, **caracterizado porque** el oligorribonucleótido es el AON de SEQ ID NO: 35.
- 15 5. Un oligorribonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** los enlaces internucleosídicos son modificados químicamente.
6. Un oligorribonucleótido antisentido según la reivindicación 5, en el que la modificación de los enlaces internucleosídicos es un enlace de fosforotioato.
- 20 7. Un oligorribonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** los residuos de azúcar del oligorribonucleótido son 2'-O-alquilo inferior.
8. Un oligorribonucleótido antisentido según la reivindicación 7, en el que el 2'-O-alquilo es un residuo de azúcar sustituido por 2'-O-metilo.
9. Un oligorribonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** la longitud se selecciona del grupo que consiste en 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos.

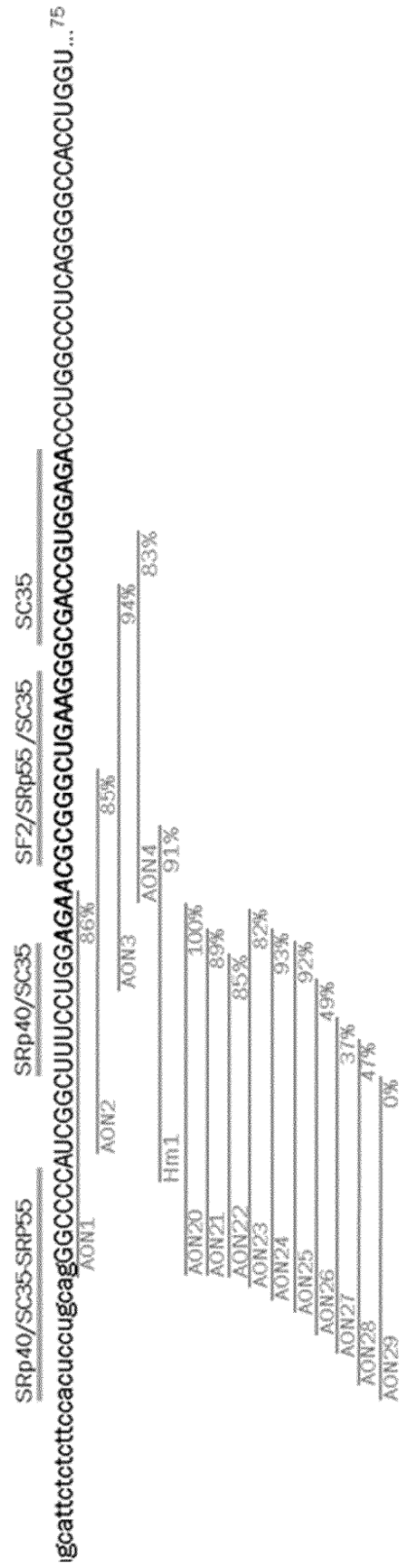
25

**FIGURA 1**

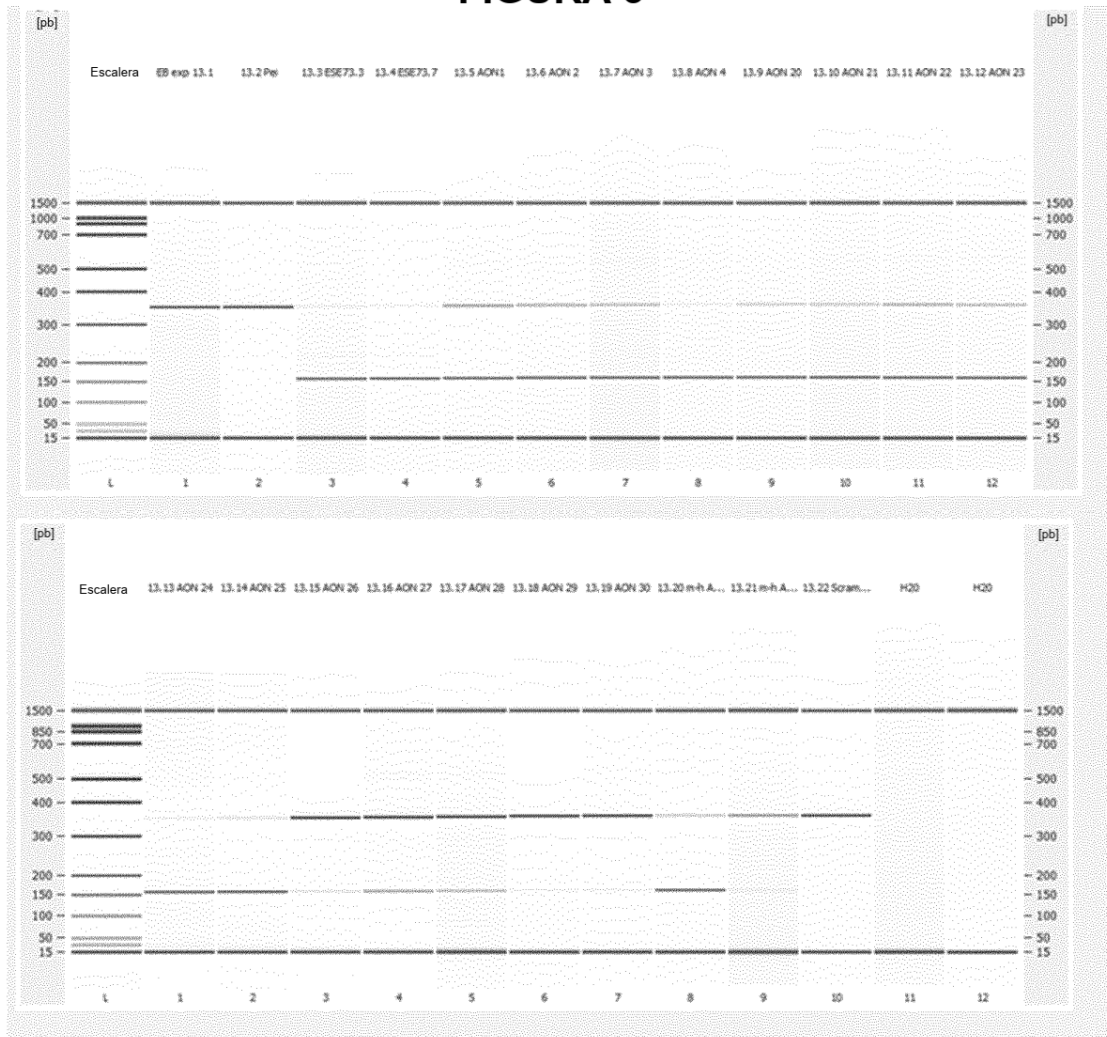
**Exón 73 humano (201b)**

5" ...agcattctcttccaactcctgcagGCCCCATCGGCTTTCCTGGAGAACGCGGGCTGAAGGGGACCGTGG  
AGACCCTGGCCCTCAGGGGCCACCTGTCTGGCCCTTGGGAGAGGGCCCCCGGGCCTTCCGGCC  
TTGCCGGGAGCCTGGAAGCCTGGTATTCCTGGCTCCAGGCTGGGGTGTGGAGAGGC  
AGGAAGCCAGGAGAGAGGgtgaggctggggctggccaggaga...3"

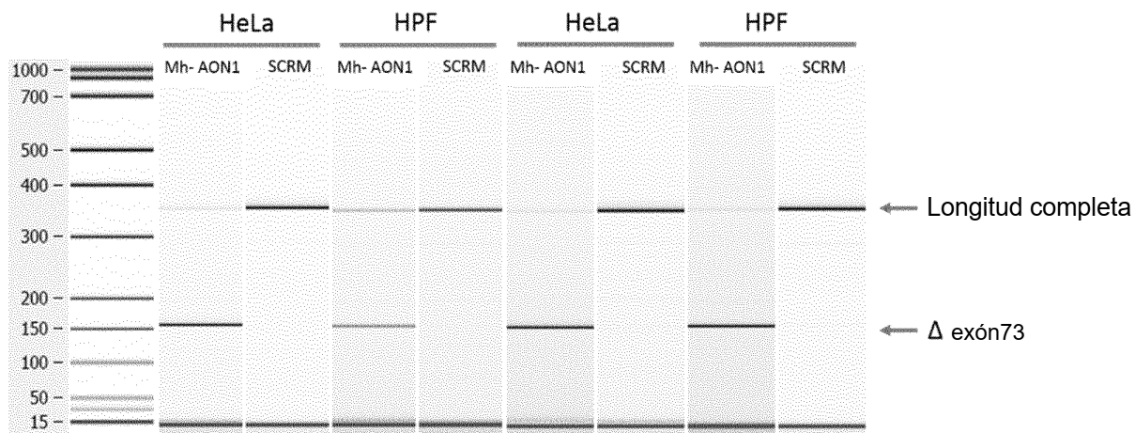
FIGURA 2



**FIGURA 3**

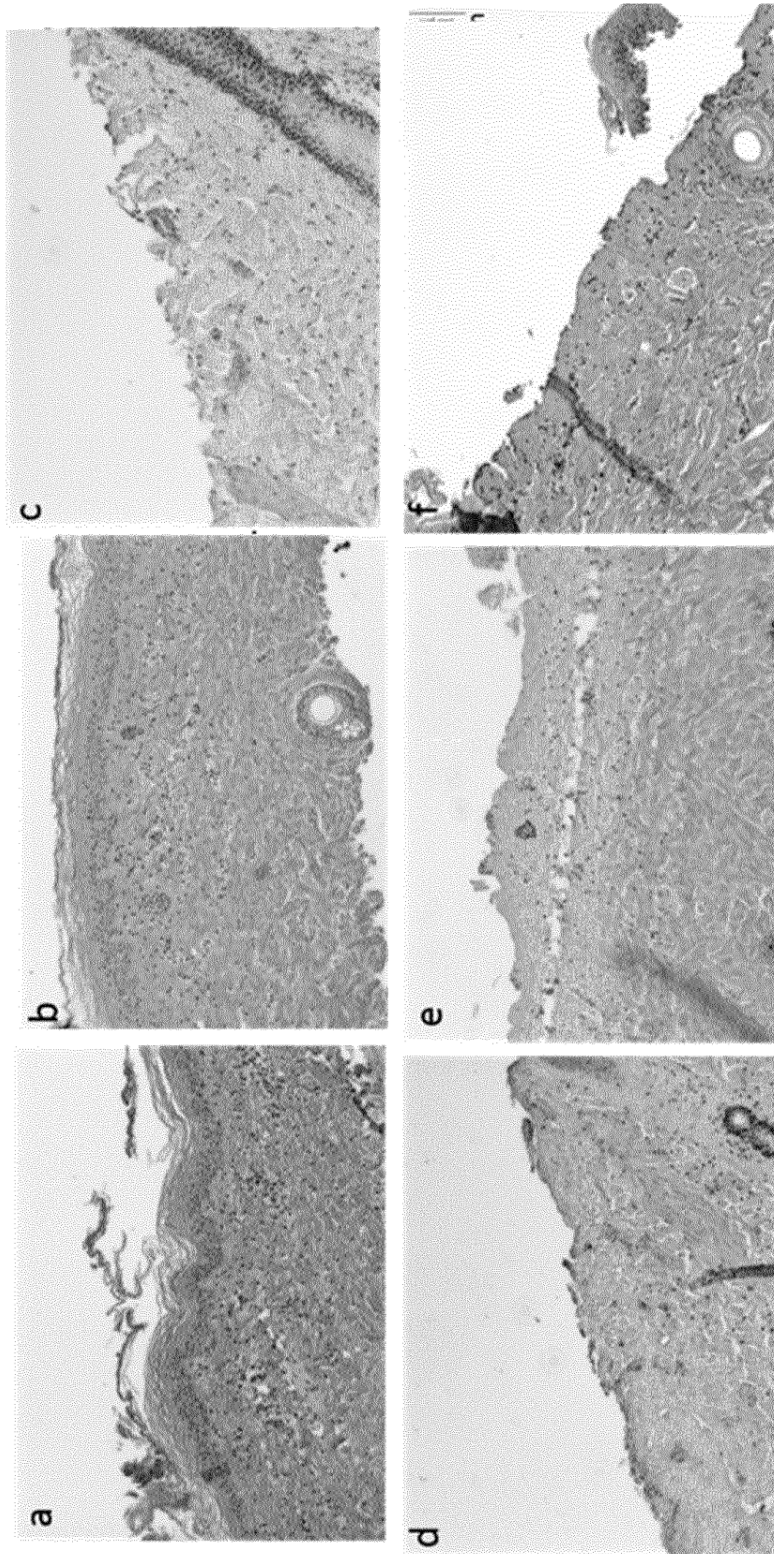


**FIGURA 6**

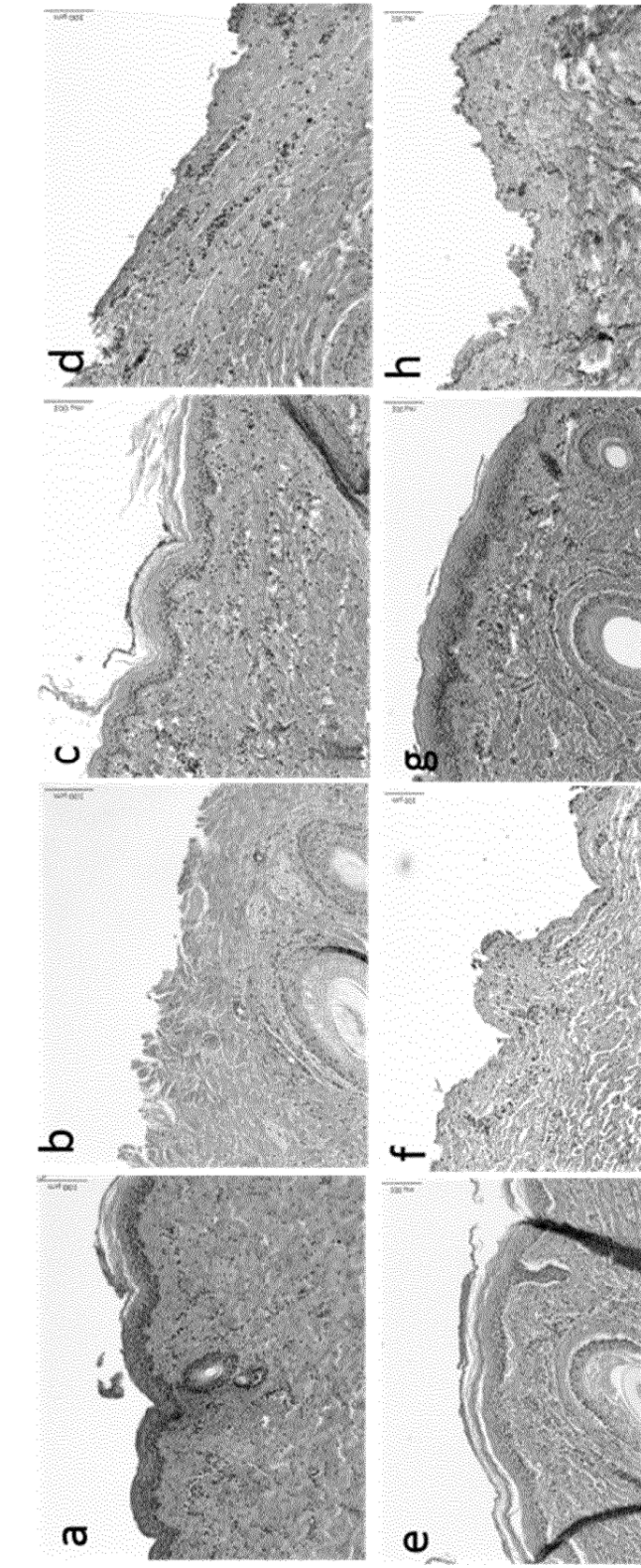




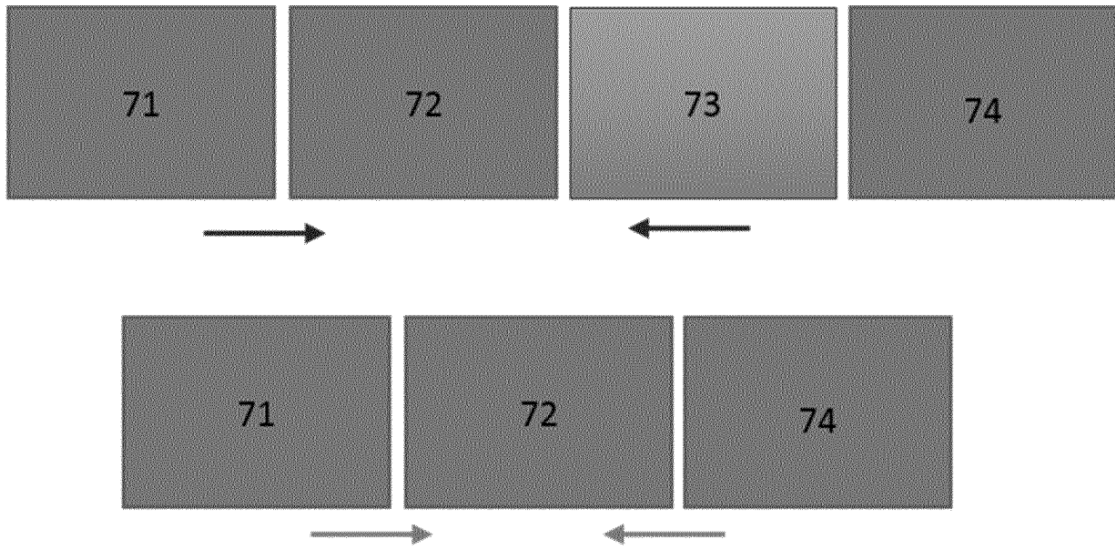
**FIGURA 4**



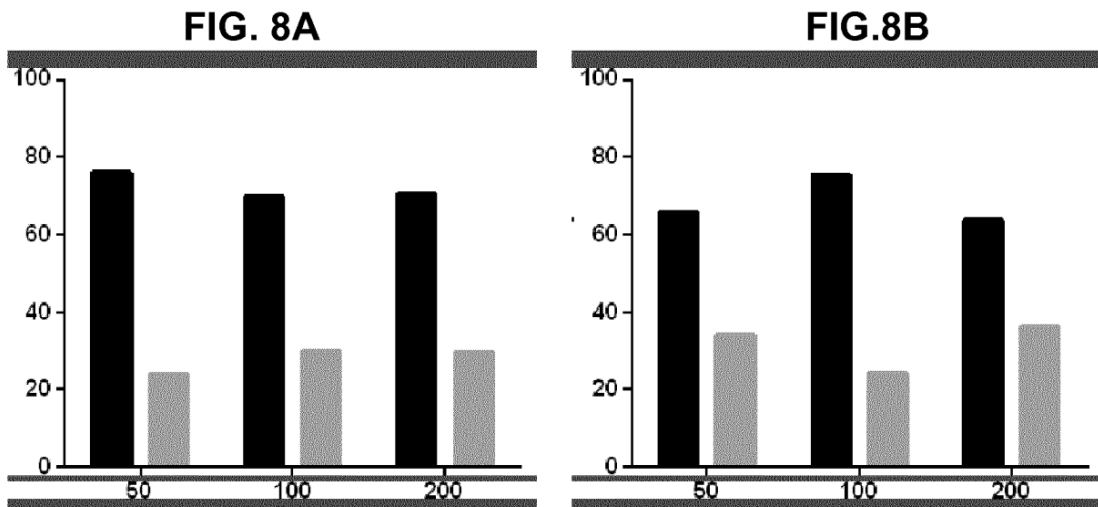
**FIGURA 5**



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**



**FIGURA 9**

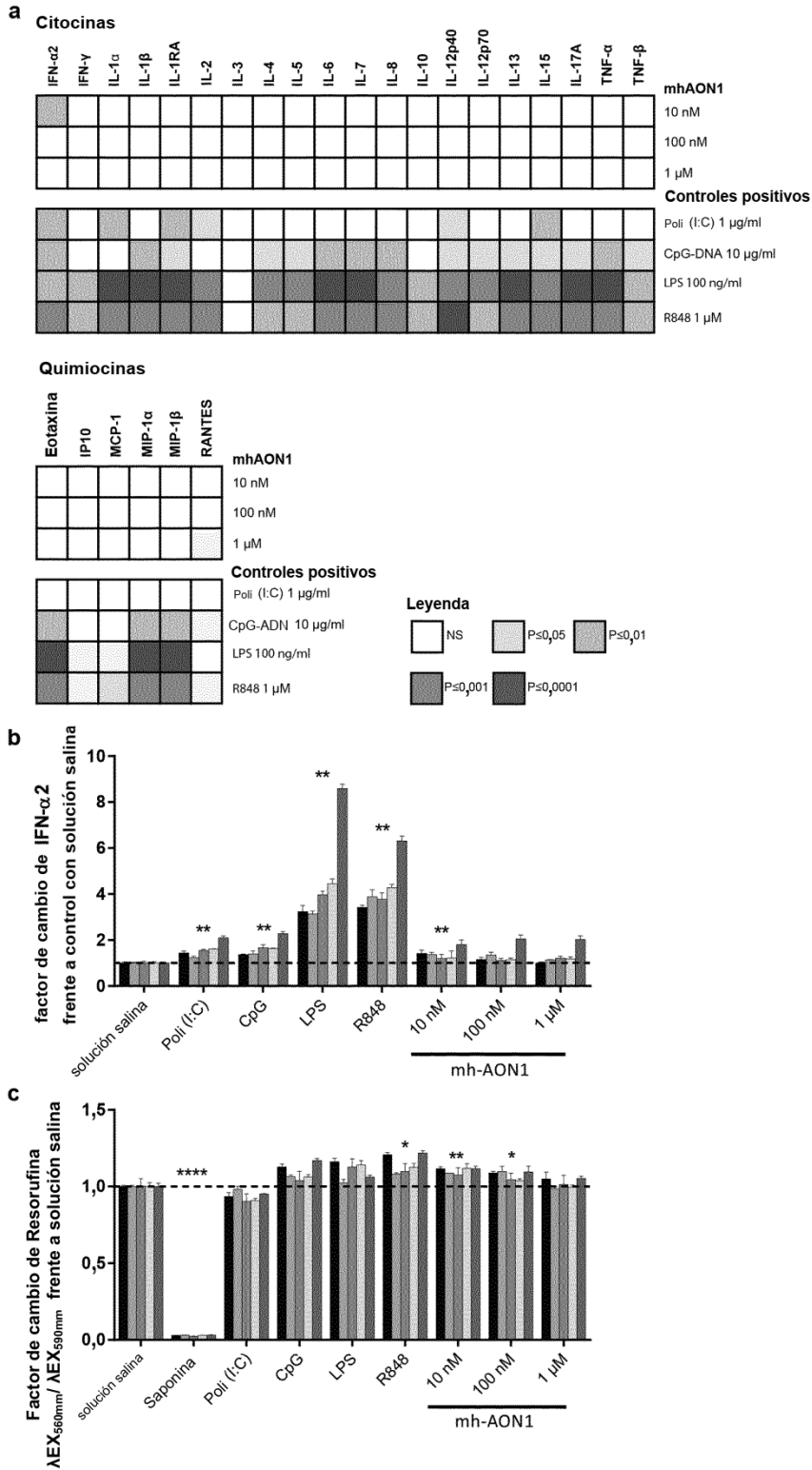


FIGURA 10

