

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 375**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2015** **PCT/EP2015/080347**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16097212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2015** **E 15813826 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020** **EP 3234134**

54 Título: **Edición direccionada de ARN**

30 Prioridad:

17.12.2014 GB 201422511

16.07.2015 GB 201512467

17.07.2015 GB 201512595

14.12.2015 GB 201521987

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.03.2021

73 Titular/es:

PROQR THERAPEUTICS II B.V. (100.0%)

Zernikedreef 9

2333 CK Leiden, NL

72 Inventor/es:

KLEIN, BART y

PLATENBURG, GERARDUS JOHANNES

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 810 375 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

Edición direccionada de ARN

Campo técnico

- 5 La invención está en el campo de la edición de ARN, mediante la cual la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ARN diana se modifica, por ejemplo, para corregir una mutación

Técnica antecedente

- 10 La edición de ARN es un proceso natural a través del cual las células eucariotas alteran la secuencia de las moléculas de ARN, a menudo de forma precisa y específica del sitio, aumentando así el repertorio de ARN codificados por el genoma en varios órdenes de magnitud. Las enzimas de edición de ARN se han descrito para especies eucariotas en todo el reino animal y vegetal, y estos procesos juegan un papel importante en el manejo de la homeostasis celular en metazoos de las formas de vida más simples, como *Caenorhabditis elegans*, en humanos. Ejemplos de edición de ARN son las conversiones de adenosina a inosina y citidina a uridina a través de enzimas llamadas adenosina desaminasa y citidina desaminasa, respectivamente. El sistema de edición de ARN más ampliamente estudiado es la enzima adenosina desaminasa. La adenosina desaminasa es una proteína multidominio, que comprende un dominio de reconocimiento y un dominio catalítico. El dominio de reconocimiento reconoce una secuencia y/o conformación específica de ARNs, mientras que el dominio catalítico convierte una adenosina en inosina en una posición cercana, más o menos predefinida, en el ARN diana, por desaminación de la nucleobase. La maquinaria de traducción de la célula lee la inosina como guanina, lo que significa que, si una adenosina editada se encuentra en una región codificante de un ARNm o pre-ARNm, puede recodificar la secuencia de la proteína. La conversión de A a I también puede ocurrir en la secuencia no codificante de 5' de un ARNm objetivo, creando nuevos sitios de inicio de traducción corriente arriba del sitio de inicio original, lo que da lugar a proteínas extendidas en N-terminal. Además, las conversiones de A a I pueden tener lugar en elementos de empalme en intrones o exones en pre-ARNm, alterando así el patrón de empalme. Los exones se pueden incluir u omitir, como consecuencia de dicha edición de ARN. Las adenosina desaminasas son parte de la extensa familia de enzimas llamadas adenosina desaminasas que actúan sobre el ARN (ADAR), incluidas las desaminasas humanas hADAR1, hADAR2 y hADAR3.

- 30 El uso de oligonucleótidos para editar un ARN diana es conocido en la técnica, por ejemplo, véase Montiel-Gonzalez et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences 2013 5 de noviembre de 2013, vol. 110, No. 45, pp. 18285-18290). Los autores describieron la edición dirigida de un ARN diana utilizando una proteína de fusión genéticamente modificada, que comprende un dominio de adenosina desaminasa de la proteína hADAR1, fusionada con el llamado dominio de unión de la caja B de la proteína N del bacteriófago lambda. El dominio de reconocimiento natural de hADAR1 había sido eliminado para eliminar las propiedades de reconocimiento de sustrato del ADAR natural y reemplazarlo por el dominio de reconocimiento de la caja B de la proteína N lambda. La caja B es un tramo corto de ARN de 17 nucleótidos que es reconocido por el dominio de unión de la caja B de la proteína B. Los autores crearon un oligonucleótido antisentido que comprende una parte de ARN guía que es complementaria a la secuencia diana para editar fusionada a una porción de caja B para el reconocimiento específico de secuencia por la proteína de fusión de dominio N-desaminasa. Los autores mostraron de forma diáfana que la guía de oligonucleótidos de ARN dirigió fielmente la proteína de fusión de adenosina desaminasa al sitio diana, lo que resultó en la edición A a I específica del sitio dirigida por ARNg del ARN diana.

- 40 Una desventaja del procedimiento propuesto es la necesidad de una proteína de fusión que consiste en el dominio de unión de la caja B de la proteína N del bacteriófago lambda, genéticamente fusionada al dominio de adenosina desaminasa de una proteína ADAR natural truncada. Esto requiere que las células diana sean transducidas con la proteína de fusión, lo que es un obstáculo importante, o que las células diana sean transfectadas con un constructo de ácido nucleico que codifique la proteína de fusión de adenosina desaminasa diseñada para la expresión en las células diana. Este último no constituye un obstáculo menor cuando la edición se debe lograr en un organismo multicelular, como en la terapia contra la enfermedad humana.

- 45 Vogel et al. (Angewandte Chemie. Int. Ed. 2014, 53, 6267-71) divulgan la edición de eCFP y Factor V Leiden que codifican ARN utilizando un ARN guía sustituido con bencilguanina y una proteína de fusión genéticamente modificada, que comprende los dominios de adenosina desaminasa de ADAR1 o 2 genéticamente fusionados para un dominio de etiqueta SNAP (una O6-alquilguanina-ADN-alquil transferasa modificada). Aunque la proteína de fusión de desaminasa artificial modificada genéticamente podría dirigirse a un sitio de edición deseado en los ARN diana en las células HeLa en cultivo, utilizando ARN guía unido covalentemente (a través de bencilguanina), este sistema presenta inconvenientes similares a los ADAR modificados genéticamente descritos anteriormente, en el sentido de que no está claro cómo aplicar el sistema sin tener que modificar genéticamente el ADAR primero y luego transfectar o transducir las células que albergan el ARN diana, para proporcionar a las células esta proteína genéticamente modificada. Claramente, este sistema no es fácilmente adaptable para su uso en humanos, por ejemplo, en un entorno terapéutico.

Otra técnica de edición que utiliza oligonucleótidos se conoce como sistema CRISPR/Cas9, pero este complejo de edición actúa sobre el ADN. Este último procedimiento tiene el mismo inconveniente que los sistemas ADAR diseñados

anteriormente, ya que requiere la administración conjunta a la célula diana de la enzima CRISPR/Cas9, o un constructo de expresión que lo codifique, junto con el oligonucleótido guía.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevas técnicas que puedan utilizar rutas celulares endógenas para editar ácidos nucleicos endógenos en células de mamíferos, incluso en organismos completos, sin los problemas asociados con los procedimientos de la técnica anterior.

Divulgación de la invención

Un primer aspecto de la invención proporciona un constructo de oligonucleótidos para la edición dirigida al sitio de un nucleótido en una secuencia de ARN diana en una célula eucariota, dicho constructo de oligonucleótidos comprende: (a) una porción de direccionamiento, que comprende una secuencia antisentido complementaria a parte del ARN diana; y (b) una porción de reclutamiento que es: capaz de formar una estructura intramolecular de tallo-bucle; capaz de unirse y reclutar una enzima de edición de ARN presente de forma natural en dicha célula; y capaz de realizar la edición de dicho nucleótido.

La presente invención elimina los inconvenientes de los procedimientos de acuerdo con la técnica anterior al proporcionar un enfoque dirigido a la edición de ARN usando constructos de oligonucleótidos que comprenden una porción de direccionamiento específica para la secuencia de ácido nucleico diana por editar y una porción de reclutamiento capaz de enlazar y reclutar una enzima de edición de ácido nucleico naturalmente presente en la célula. La función de la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos es unirse selectivamente con suficiente afinidad a una enzima de edición de ARN endógena y residente en la célula, redirigiendo dicha enzima a un sitio diana preseleccionado por medio de la porción de direccionamiento del constructo de oligonucleótidos de la invención, promoviendo así la edición de residuos de nucleótidos preseleccionados en una región del ARN diana que corresponde a la porción de diana del constructo de oligonucleótidos.

La estructura de tallo-bucle puede residir corriente arriba (5') o corriente abajo (3') de la porción de direccionamiento (preferiblemente corriente arriba). Alternativamente, la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos puede interrumpir la porción de direccionamiento de tal manera que parte de la porción de direccionamiento se encuentra corriente arriba de la porción de reclutamiento y parte de la porción de direccionamiento se encuentra corriente abajo de la porción de reclutamiento, haciendo que la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos se repita después de que el constructo de oligonucleótidos se hibrida con el ARN diana.

Según otra realización, la porción de reclutamiento comprende un segmento de ARNs que imita, es decir, es idéntico o similar en estructura a, una secuencia de ARN de la que se sabe que es editada por enzimas de edición de ARN de origen natural. Esta secuencia de ARN que se conoce como un sustrato natural para la edición de ARN comprende un segmento de ARNs, que comprende preferiblemente un único segmento de ARN que se pliega sobre sí mismo a través de un emparejamiento de nucleobase complementario, formando así una estructura de horquilla o tallo-bucle. Dos ejemplos de secuencias de ARN editadas conocidas que se han caracterizado con gran detalle se encuentran en la subunidad B del receptor de glutamato del subtipo de ácido 3-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) (GluR-B). Este sistema modelo comprende dos sitios editados con frecuencia en los que el AGA codificado por ADN se edita en IGA, dando como resultado una sustitución de arginina a glicina (sitio R/G) y una sustitución distinta de glutamina a arginina (sitio Q/R). Se sabe que el sitio GluR-B (R/G) comprende una estructura de tallo-bucle que consta de 71 nucleótidos que comprenden 3 emparejamientos erróneos, 2 A·C y un par de bases de oscilación G·U. Curiosamente, el bucle consiste en una estructura GCUAA de estructura pentabucle bien conservada que se ajusta a una secuencia GCUMA conservada filogenéticamente, en la que M es A o C (Aruscavage P.J. and Bass B.L. RNA. 2000; 6: 257-269). Parece haber cierta preferencia por la edición de las dos adenosinas oscilantes, con una eficacia creciente cuando la base opuesta a la adenosina editada se selecciona de citidina o uridina, prefiriéndose la citidina.

Esta estructura puede usarse convenientemente como está, o adaptarse cuando se usa en un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención, como una porción de reclutamiento, reduciendo o aumentando el número de pares de nucleobases oscilantes en el tallo para modificar la especificidad de la edición y/o redirigir la edición a los sitios preferidos en la secuencia de ARN diana. Además, o alternativamente, el sitio de reconocimiento de GluR-B para hADAR1 puede modificarse acortando el tallo sin abolir por completo el reconocimiento. Tal acortamiento puede ser conveniente desde la perspectiva de la capacidad de fabricación o el coste del producto, y similares.

Un ejemplo de una porción de reclutamiento derivada del dominio GluR-B comprende la secuencia: 5'-(AUA^{N^a})_nUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA(N^bUAU)_n-3', en la que N^a y N^b son cada uno nucleótidos que pueden ser A, G, C o U, con la condición de que N^a y N^b formen un par de bases de desajuste tras la formación de una estructura de tallo-bucle, y n es 1 o 0 (es decir, SEQ ID NOs: 6 y 7). Un ejemplo útil de dicha porción de reclutamiento incluye esta secuencia donde n=1, con extensiones adicionales en las direcciones 5' y 3', por ejemplo, donde cada extensión tiene de 1 a 10 nucleótidos de largo (o más, por ejemplo, de 1 a 20 nucleótidos o más). Por ejemplo, extender 3 nucleótidos adicionales en cada dirección da (SEQ ID NO: 23) 5'-GGAAUAN^aUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAN^bUAUCCC-3', como se ve dentro de SEQ ID NOs: 20-22 (en el que N^a=N^b=G). Esta extensión adicional puede mejorar la eficiencia de corrección.

Otro ejemplo de una porción de reclutamiento basada en un sustrato receptor de GluR-B natural de longitud completa es 5'-GUGGAUUAUUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUANⁿUAUCCCCAC-3' (SEQ ID NO: 24; secuencia extendida relativa al párrafo anterior subrayado), como se usa más adelante en los Ejemplos. La porción de reclutamiento del receptor GluR-B de longitud completa en combinación con las porciones de direccionamiento para el transcrito A1AT con la mutación G a A en la posición 9989 asociada con la deficiencia de A1AT se describe en el Ejemplo 4. La porción de reclutamiento del receptor GluR-B de longitud completa en combinación con porciones de direccionamiento para la transcripción LRRK2 con la mutación G2019S, asociada con la enfermedad de Parkinson, se describe en el Ejemplo 5.

La porción de reclutamiento puede estar unida en el extremo 5' o 3' a una porción de direccionamiento, opcionalmente a través de un enlazador "L" que comprende uno o más nucleótidos, un oligopéptido u otro enlazador químico, tal como polietilenglicol (PEG).

La porción de direccionamiento puede comprender una secuencia que es complementaria a la secuencia de ARN diana representada por la fórmula general:

$N^1N^2N^3N^4N^5N^6N^7N^8N^9N^{10}N^{11}N^{12}N^{13}N^{14}N^{15}N^{16}N^{17}CN^{18}N^{19}N^{20}$ (SEQ ID NO: 8),

en la que N^1 a N^{20} , dependiendo de la secuencia complementaria en la secuencia de ARN diana, cada uno independientemente es A, G, C o U, en la que N^4 forma preferiblemente un par de bases de desajuste con su nucleótido opuesto en la secuencia de ARN diana cuando la porción de direccionamiento es recocida a su secuencia de ARN diana, y N^{10} y N^{16} forman pares de bases oscilantes con su nucleótido opuesto en la secuencia de ARN diana cuando la porción diana se fusiona a su secuencia de ARN diana, y C es citidina opuesta a la adenosina en la secuencia de ARN diana que es una diana para la desaminación.

Los pares de bases que no coinciden son los pares de bases G-A, C-A, U-C, A-A, G-G, C-C, U-U. Los pares de bases oscilantes son: pares de bases G-U, I-U, I-A e I-C. La porción de direccionamiento puede tener más de 20 nucleótidos, tanto como 200 nucleótidos o más, aunque se cree que no es necesario más de 50 y se prefiere menos de 40. Aún más preferidos son las porciones de reclutamiento más cortas que 30 nucleótidos, preferiblemente más cortas que 25 nucleótidos.

Preferentemente, la porción de direccionamiento comprende grupos metilo 2'-O en cada posición que se opone a una adenosina cuando la porción de direccionamiento se fusiona a la secuencia de ARN diana si esa adenosina en la secuencia de ARN diana no es una diana para la edición. De manera más general, para proteger la porción de direccionamiento de la degradación por las nucleasas, se prefiere que todos los nucleótidos comprendan grupos 2'-O-metilo, excepto el nucleótido opuesto a la adenosina diana y los nucleótidos vecinos de dicho nucleótido opuesto (uno 5' y uno 3'), que debe comprender grupos 2'-OH.

De acuerdo con una realización preferida, la porción de reclutamiento comprende una secuencia de ADN: $(CG)_3N^1N^n(CG)_3$, en la que cada uno de N^1 a N^n puede ser igual o diferente y puede seleccionarse de guanosina, adenosina, timidina, citidina e inosina, 'n' está entre 2 y 20, preferiblemente entre 2 y 10, más preferiblemente entre 2 y 5, aún más preferiblemente entre 3 y 5, lo más preferiblemente 4 o 5. Por lo tanto, hay tres repeticiones CG que flanquean hasta 20 nucleótidos intermedios. Esta secuencia de ADN es capaz de formar una estructura tallo-bucle. De acuerdo con una realización preferida adicional, la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos es una estructura de ADN que comprende la secuencia: $(CG)_3T_n(CG)_3$, en la que N es un número entero de 3-5, preferiblemente 4, $(CGCGCGTTTTCGCGCG$; SEQ ID NO: 5). Esta secuencia de ADN es capaz de formar una estructura tallo-bucle. Además, se ha descrito en la técnica que la secuencia $(CG)_3T_4(CG)_3$ forma una conformación de Z-ADN bajo condiciones fisiológicas y que esta estructura de Z-ADN está reconocida y unida por hADAR1 (letras FEBS 458:1 1999 Sep 10 páginas 27-31). Como anteriormente para la porción de reclutamiento de ARNs, esta porción de reclutamiento de Z-ADN puede estar corriente arriba o corriente abajo de la porción diana, o interrumpir la porción diana que separa la porción diana en un segmento de corriente arriba y un segmento de flujo descendente, por lo que la porción de reclutamiento de ADN sale en bucle cuando las porciones de objetivo se recogen al ARN diana. De acuerdo con esta realización, las bases de citidina son preferiblemente 5-metilcitidina, para reducir la inmunogenicidad potencial asociada con las secuencias de CpG.

Los oligonucleótidos según la presente invención comprenden una porción de direccionamiento (es decir, una porción que dirige el oligonucleótido a la posición correcta en la secuencia de ARN diana) y una porción de reclutamiento (es decir, una porción que tiene como función principal reclutar la enzima de edición), por ejemplo, un ADAR, y no es necesariamente complementario, preferiblemente no complementario, con el ARN diana en la región de la(s) adenosina(s) que son las dianas para la edición. Esta estructura bipartita distingue claramente los oligonucleótidos de la invención de los oligonucleótidos conocidos como los descritos en la técnica anterior (por ejemplo, WO2014/011053, WO2005/094370 y Woolf et al, 1995. PNAS USA 92, 8298-8302) que son esencialmente complementarios a la diana en toda su longitud y no comprenden una porción de reclutamiento (ciertamente no una que no sea complementaria al ARN diana, sino que tenga afinidad por la entidad de edición, como con la presente invención). Por lo tanto, se prefiere de acuerdo con la invención proporcionar un constructo de oligonucleótidos para la edición dirigida al sitio de un nucleótido en una secuencia de ARN diana en una célula eucariota, comprendiendo dicho constructo de oligonucleótidos:

(a) una porción de direccionamiento, que comprende una secuencia antisentido complementaria a parte del ARN diana; y

(b) una porción de reclutamiento que no es complementaria a la secuencia de ARN diana y es capaz de unirse y reclutar una enzima de edición de ARN presente de forma natural en dicha célula y capaz de realizar la edición de dicho nucleótido.

De acuerdo con aún otra realización, la porción de reclutamiento puede ser un aptámero seleccionado para unirse a la enzima de edición residente en la célula. Los procedimientos para seleccionar aptámeros son bien conocidos en la técnica. Los aptámeros que se unen a la enzima de edición sin abolir la actividad desaminasa pueden seleccionarse como porción de reclutamiento y fusionarse fácilmente con la porción de direccionamiento del constructo oligonucleotídico de acuerdo con la invención, usando cualquier tipo de enlazador incluyendo enlace internucleosídico regular (fosfodiéster) o modificado (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato), enlace peptídico, o cualquier otro enlace químico, como el polietilenglicol.

De acuerdo con aún otra realización de la invención, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión del mismo, o un anticuerpo camélido, que se une a una enzima de edición residente en la célula sin abolir la actividad de edición, puede seleccionarse como una porción de reclutamiento y fusionado a la porción de direccionamiento del constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

El término "constructo de oligonucleótidos" puede referirse a un solo oligonucleótido, un complejo de dos o más oligonucleótidos (incluido un aptámero) con afinidad entre sí (complementariedad antisentido o de otro modo), o un complejo de un oligonucleótido y una porción de unión proteica (tal como un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o dominio de unión), que puede unirse directamente o mediante un PEG u otro enlazador.

Por lo tanto, la presente invención proporciona constructos de oligonucleótidos y procedimientos para la edición específica del sitio de secuencias de ARN diana en una célula, sin la necesidad de transducir o transfectar la célula con enzimas de edición genéticamente modificadas. Debido al diseño de los constructos de oligonucleótidos, las entidades de edición, como ADAR, son reclutadas y dirigidas a los sitios de edición elegidos por el experimentador. Estos constructos y procedimientos de oligonucleótidos de la invención se pueden usar convenientemente para realizar cambios en las secuencias de ARN diana, por ejemplo, para revertir las mutaciones que están involucradas o causan enfermedades, aliviando así los síntomas de la enfermedad. Se sabe que las entidades de edición de ARN editan sus sustratos de manera muy eficiente, con frecuencias muy superiores a la reparación de ADN o ARN mediada por oligonucleótidos. Esto es de gran ventaja cuando se usa en el tratamiento de enfermedades.

La porción de direccionamiento y la porción de reclutamiento en un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden ser directamente adyacentes. Alternativamente, la porción de direccionamiento y la porción de reclutamiento pueden estar unidas covalentemente a través de un enlazador. El enlazador puede comprender residuos de nucleótidos no específicos (no específicos en el sentido de que no son necesariamente complementarios a la secuencia de ARN diana ni tienen afinidad con una entidad de edición residente en la célula), enlazadores de péptidos (oligo) u otros enlazadores químicos. De acuerdo con aún otra realización, la porción de direccionamiento y la porción de reclutamiento pueden proporcionarse como dos secuencias de oligonucleótidos separadas, es decir, no unidas covalentemente, que comprenden complementariedad antisentido capaz de formar un ARNds o una estructura híbrida de ADN:ARN. La formación de tal constructo de ARNds u oligonucleótido híbrido puede tener lugar antes de la administración a la célula o al sujeto a tratar, o después de la administración de los dos oligonucleótidos separados, in vitro o in vivo, por ejemplo, en el sujeto por tratar.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en la edición dirigida al sitio de un nucleótido en un ARN diana en una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero, más preferiblemente una célula humana, a través de la acción de una enzima de edición de ARN presente de forma natural en dicha célula y capaz de realizar la edición de dicho nucleótido. También se describe un procedimiento para realizar un cambio en una secuencia de ARN diana en una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero, que comprende pasos de: (i) introducir en dicha célula un constructo de oligonucleótidos que comprende una porción de direccionamiento, que comprende una secuencia que es suficientemente complementaria a la secuencia de ARN diana para unirse mediante el emparejamiento de nucleobase a dicho ARN diana y una porción de reclutamiento, que comprende una secuencia que es reconocido por una entidad de edición de ARN que está presente naturalmente en dicha célula eucariota, preferible de mamífero; (ii) dejar suficiente tiempo para que la entidad de edición de ARN realice una reacción de edición en la secuencia de ARN diana; y (iii) identificar la presencia del cambio en la secuencia de ARN. La reacción de edición puede llevarse a cabo por dicha entidad de edición en una o más nucleobases dentro de la región de solapamiento entre la secuencia de ARN diana y la porción de diana del constructo oligonucleotídico. Se prefiere que la porción de direccionamiento del constructo de oligonucleótidos comprenda un desajuste opuesto a la(s) nucleobase(s) por editar. Se prefiere además que la reacción de edición comprenda una conversión de A a I por desaminación de la nucleobase de adenosina en la secuencia de ARN diana. De acuerdo con el último procedimiento, se prefiere uno en el que el constructo de oligonucleótidos comprenda una C opuesta a la adenosina por editar. De acuerdo con otro procedimiento preferido, la reacción de edición es una conversión de C a U a través de la desaminación de la nucleobase de citidina; se prefiere

de acuerdo con el último procedimiento que la porción de direccionamiento del constructo de oligonucleótidos comprenda una A opuesta a la C en la secuencia de ARN diana por editar.

También se describe un procedimiento para editar una secuencia de ARN diana CFTR mutante en una célula humana, que comprende los pasos de: (i) introducir en dicha célula un constructo de oligonucleótidos que comprende una porción de direccionamiento que es complementaria a la secuencia de ARN diana CFTR y una porción de reclutamiento capaz de reclutar una entidad de edición de hADAR; y (ii) dejar suficiente tiempo para que la entidad de edición de hADAR edite nucleobases en o cerca de una región de superposición entre la secuencia de ARN diana y la porción de diana del constructo de oligonucleótidos. Se prefiere que el ARN diana CFTR mutante (un pre-ARNm o ARNm) comprenda una mutación G551D, y la reacción de edición hace que una adenosina se convierta en una inosina invirtiendo así la mutación G551D en dicha secuencia de ARN diana. Hay dos codones para el ácido aspártico (D); GAU y GAC. Por lo tanto, un paciente con fibrosis quística con la mutación G551D puede tener una mutación GAU o GAC en la posición correspondiente al codón 551 de la proteína CFTR. La desaminación de la A en la segunda posición del codón conducirá a la formación de una I, que será leída por la maquinaria de traducción como una G. Por lo tanto, la desaminación de la A en la segunda posición del codón mutado crea GIU o GIC, respectivamente, que se leen de facto como GGU y GGC. Tanto GGU como GGC codifican glicina, de modo que la edición de ARN de ambos codones G551D mutados por una adenosina desaminasa producirá un triplete de codificación de glicina adecuado, invirtiendo efectivamente la mutación a una proteína CFTR normal.

Para una persona experta en la materia, estará claro que la mutación G551D se usa solo como un ejemplo y de ninguna manera limita el alcance de la invención. Hay literalmente miles de enfermedades genéticas causadas por sustituciones de un solo par de bases que son susceptibles de reversión utilizando constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención, reclutando ya sea una desaminasa, como las adenosina desaminasas descritas en detalle aquí, o una citidina desaminasa.

El reclutamiento de citidina desaminasa en un sitio diana funciona de la misma manera que para las adenosina desaminasas hADAR1 y hADAR2. Sin embargo, las citidina desaminasas tienen diferentes requisitos de unión y reconocen diferentes estructuras en sus secuencias de ARN diana que determinan la edición de la citidina. Una citidina aminasa particularmente bien estudiada es el Apobec1 humano. El principio general de la edición de ARN utilizando un constructo de oligonucleótidos para direccionar a un sitio de edición y para reclutar una enzima de edición residente, naturalmente presente, sigue siendo el mismo para las citidina desaminasas, y es parte de la invención divulgada y reivindicada en este documento.

Descripción detallada de la invención

Los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención son únicas porque combinan dos funciones esenciales; se unen para presentar naturalmente enzimas de edición de ARN con una cierta afinidad y se unen a través del emparejamiento de bases complementarias antisentido (Watson-Crick) al sitio en la secuencia de ARN diana donde se realizará la edición, reclutando así las enzimas de edición de ARN al sitio de edición. Una enzima "presente naturalmente" está presente en una célula sin la necesidad de intervención humana previa. Por lo tanto, una enzima truncada o recombinante (como se describe en Montiel-Gonzalez et al., y Vogel et al.) no está naturalmente presente en una célula; pueden estar presentes en una célula, pero solo después de la intervención humana (transducción o transfección). La invención puede funcionar así usando enzimas de edición de ARN de tipo salvaje que son endógenas a una célula.

Se entenderá que dicho reclutamiento no necesita ser cuantitativo, ya que todas las enzimas de edición de ARN residentes en la célula se reclutarán para la edición de la secuencia de ARN diana de elección. Se espera, e incluso se considera deseable, si un porcentaje de enzimas de edición residentes permanecen disponibles para actuar sobre sus sustratos naturales. Además, en ciertas realizaciones, por ejemplo, donde la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos es una secuencia de ARNs que comprende adenosinas, el dominio catalítico de la enzima de edición de ARN, una vez reclutada por el constructo de oligonucleótidos, puede actuar sobre la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos, así como sobre el sustrato de edición en la porción de ARNs creada por la fusión de la porción de direccionamiento a la secuencia complementaria en la secuencia de ARN diana. Esto no es un problema en todas las circunstancias, ya que puede haber aplicaciones en las que sea deseable la sobre edición. En los casos en que se debe evitar la edición excesiva, una porción de direccionamiento puede modificarse químicamente en su totalidad, por ejemplo, proporcionando a todos los nucleótidos un resto de azúcar metilado en 2'-O, excepto en los nucleótidos opuestos a la adenosina diana(s) y los dos nucleótidos (uno 5' y uno 3') que flanquean cada nucleótido opuesto a la adenosina diana. En general, una adenosina en un ARN diana puede protegerse de la edición proporcionando un nucleótido opuesto con un grupo 2'-OMe, o proporcionando una guanina o adenina como base opuesta, ya que estas dos nucleobases pueden evitar la edición de la adenosina opuesta.

Los constructos de oligonucleótidos

La porción de reclutamiento de los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención se caracteriza por una estructura de ARNs o ADNds con tallo-bucle intramolecular. Una forma de establecer una estructura oligonucleotídica bicatenaria en una sola molécula es establecer una secuencia palindrómica que sea capaz de plegarse sobre sí misma durante al menos parte de su longitud. Dichas estructuras de tallo-bucle pueden surgir de (1) secuencias de ARN

artificiales capaces de formar una estructura de tallo-bucle, (2) secuencias de ADN artificial capaces de formar una estructura de tallo-bucle, (3) secuencias de ARN tomadas de sustratos de ARN conocidos para editar entidades residentes en la célula. Por ejemplo, un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede comprender una porción de reclutamiento similar en secuencia al sitio de reconocimiento natural para la actividad de edición, o puede imitar ese sitio de reconocimiento de una manera similar a un aptámero. Cada una de estas realizaciones se describirá con más detalle a continuación. Además, los expertos en la técnica serán capaces de realizar diseños y reclutar porciones basadas en cada una de las realizaciones descritas con mayor detalle. Los procedimientos para diseñar y probar estructuras de ácido nucleico que tienen afinidad por las proteínas son, como tales, bien conocidos en la técnica.

La porción de direccionamiento de un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención debería tener suficiente solapamiento y complementariedad con el sitio diana para permitir la hibridación específica de secuencia del constructo de oligonucleótidos con la secuencia de ARN diana. La longitud y la cantidad de superposición pueden variar de una diana a otra, pero pueden ser determinadas rutinariamente por una persona que tenga una habilidad ordinaria en la técnica. En general, las secuencias más largas proporcionan más especificidad y, en consecuencia, menos efectos fuera de la diana, por ejemplo, a través de un enlace no específico y un enlace más fuerte al sitio diana. La porción de direccionamiento del constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención normalmente debería ser más larga que 10 nucleótidos, preferiblemente más de 11, 12, 13, 14, 15, 16 aún más preferiblemente más de 17 nucleótidos. La porción de direccionamiento es preferiblemente más corta que 200 nucleótidos, más preferiblemente más corta que 100 nucleótidos, aún más preferiblemente más corta que 50 nucleótidos, aún más preferiblemente 25 o menos nucleótidos.

De acuerdo con una realización, la invención proporciona un constructo de oligonucleótidos para realizar un cambio deseado en una o más posiciones específicas en una secuencia de ARN diana en una célula, reclutando una enzima de edición de ARN presente de forma natural en dicha célula, que tiene la secuencia 5'-X-(Y-X')_nL-Z-3', en la que X es complementario a la secuencia de ARN diana corriente abajo de la posición específica, X' es complementario a la secuencia de ARN diana corriente arriba de la posición específica, Y comprende uno o más nucleótidos (por ejemplo, hasta 10, preferiblemente entre 1 y 5, más preferiblemente entre 1 y 3, como 1 o 2) que es/no es complementario a la secuencia de ARN diana, n es un número entero de 1 a 10 (preferiblemente de 1 a 5, más preferiblemente de 1 a 3, o 1), L es una secuencia enlazadora que es opcional y puede comprender cualquier número de nucleótidos, incluido cero, y Z es una secuencia que se reconoce y se une a dicha enzima de edición de ARN. L también puede consistir en un enlace químico diferente, como un enlace peptídico (oligo) o enlace PEG.

Cuando n es mayor o igual a 1, la porción de direccionamiento del constructo oligonucleotídico no es perfectamente complementaria a la secuencia de ARN diana, sino que comprende uno o más desajustes, o bases de oscilación, que sirven para mejorar la especificidad, al aumentar la frecuencia de edición del nucleótido opuesto en la secuencia de ARN diana. Cuando n es dos o más, X' ocurre más de una vez y dos o más X' pueden ser idénticos dependiendo de la secuencia de las bases complementarias en la secuencia de ARN diana, pero con toda probabilidad, los dos o más X' no son idénticos. Cuando n es 0, la porción de direccionamiento es perfectamente complementaria a la secuencia de ARN diana en toda la longitud de la porción de direccionamiento, es decir, sin desajustes, con la secuencia de ARN diana. Es probable que esta realización provoque la edición de ARN por la adenosina desaminasa de una manera no específica, lo que significa que todas las adenosinas en la región superpuesta entre la porción diana del constructo del oligonucleótido y la secuencia de ARN diana tienen la misma probabilidad de convertirse en inosina. Cualquier edición no específica de adenosinas puede ser limitada, asegurándose de que las adenosinas a las que no deberían direccionarse, o al menos a una frecuencia más baja, encuentren un nucleótido opuesto con un resto ribosa modificado 2'-O, como un 2'-OMe, ya que se sabe que este último reduce la eficiencia de edición de la adenosina opuesta. Alternativa o adicionalmente, se puede proporcionar una base opuesta que sea una guanina o adenina, ya que estas nucleobases generalmente impiden la desaminación de la base opuesta.

Según otra realización, la invención proporciona un constructo de oligonucleótidos para realizar un cambio deseado en una posición específica en una secuencia de ARN diana en una célula, reclutando una enzima de edición de ARN presente de forma natural en dicha célula, que tenga la secuencia 5'-Z-L-(X'-Y)_nX-3', en la que X es complementario a la secuencia de ARN diana corriente arriba de la posición específica, X' es complementario a la secuencia de ARN diana corriente abajo de la posición específica, Y comprende uno o más nucleótidos que es/no es complementario a la secuencia de ARN diana (por ejemplo, hasta 10, preferiblemente de 1 a 5, más preferiblemente de 1 a 3, como 1 o 2), n es un número entero de 1 a 10 (preferiblemente de 1 a 5, más preferiblemente de 1 a 3, o 1), L es una secuencia enlazadora que es opcional y puede comprender cualquier número de nucleótidos, incluido cero, y Z es una secuencia que es reconocida y se une a dicha enzima de edición de ARN. L también puede consistir en un enlace químico diferente, tal como un enlace peptídico (oligo).

Cuando n es mayor o igual a 1, la porción de direccionamiento del constructo oligonucleotídico no es perfectamente complementaria a la secuencia de ARN diana, sino que comprende uno o más desajustes, o bases oscilantes, que sirven para mejorar la especificidad, al aumentar la frecuencia de edición del nucleótido opuesto en la secuencia de ARN diana. Cuando n es dos o más, X' ocurre más de una vez y dos o más X' pueden ser idénticos dependiendo de la secuencia de las bases complementarias en la secuencia de ARN diana, pero con toda probabilidad, los dos o más X' no son idénticas. Cuando n es 0, la porción de direccionamiento es perfectamente complementaria a la secuencia de ARN diana en toda la longitud de la porción de direccionamiento, es decir, sin desajustes, con la secuencia de ARN

diana. Es probable que esta realización provoque la edición de ARN por la adenosina desaminasa de una manera no específica, lo que significa que todas las adenosinas en la región superpuesta entre la porción diana del constructo del oligonucleótido y la secuencia de ARN diana tienen la misma probabilidad de convertirse en inosina. Cualquier edición no específica de adenosinas puede ser limitada, asegurándose de que las adenosinas que no deben ser dirigidas, o al menos a una frecuencia más baja, encuentren un nucleótido opuesto con un resto ribosa modificada en 2'-O, como un 2'-OMe, ya que se sabe que este último reduce la eficiencia de edición de la adenosina opuesta.

Un oligonucleótido de la invención puede ser una molécula híbrida de ADN/ARN, es decir, que incluye tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos dentro del mismo oligonucleótido.

Porción de reclutamiento: realizaciones preferidas

- 10 La porción de reclutamiento debe ser lo suficientemente larga como para proporcionar una estructura, tal como una estructura de ARN o ADN de tallo-bucle, preferiblemente en la conformación de Z-ARN o Z-ADN, que es reconocida por la enzima de edición de acuerdo con la invención. Si la enzima de edición es hADAR1, se conocen secuencias de ácido nucleico que proporcionan el reconocimiento y la unión por el dominio Z-alfa de la variante de 150 kDa de hADAR1.

15 Reclutamiento de porciones de estructuras artificiales de tallo-bucle de ARN o ADN

- Un ejemplo de una estructura artificial de bucle de ARN o ADN, que es una porción de reclutamiento preferida de acuerdo con la invención, comprende la secuencia $(RY)_nN_m(RY \text{ o } YR)_n$, en la que R, Y y N representan ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos y en la que R es A o G, Y es T, U o C, N es A, G, C, T, U o I, n es 3 o más, m es 1 o más (preferiblemente m es 2 o más, más preferiblemente m es 3 o más, aún más preferiblemente m es 4 o más) y en la que N forma un bucle y las dos secuencias $(RY)_n$ o $(YR)_n$ forman una estructura madre de ARNds (cuando todos los nucleótidos son ribonucleótidos) o estructura de ADNds (cuando todos los nucleótidos son desoxirribonucleótidos) a través del emparejamiento complementario de nucleobases de Watson-Crick. La porción de reclutamiento preferiblemente consiste en todos los ribonucleótidos o todos los desoxirribonucleótidos, aunque no se excluye una porción de reclutamiento que comprende ribo y desoxirribonucleótidos.

- 25 Ejemplos especialmente preferidos de las porciones de reclutamiento que se sabe que se unen a hADAR1 son (i) las estructuras de ADN representadas por $(CG)_nT_m(CG)_n$ en la que N es 3 y m es 4 o más, preferiblemente 4 o 5, que tiene una tendencia a formar las llamadas estructuras de Z-ADN, (ii) estructuras de ARN representadas por la fórmula $(RY)_nN_m(RY)_n$, en la que R es A o G, Y es C o U, N es cualquier A, G, C, o U y en la que N puede ser todos iguales o diferentes, n es 3 o más, m es 4 o más, preferiblemente 4 o 5, que tiene una tendencia a formar estructuras de Z-ARN. Las estructuras de Z-ADN y Z-ARN difieren de sus contrapartes más comunes (para ADNds la conformación B es la forma más común, mientras que para ARNds la forma A es la más común) por el hecho de que la doble hélice es zurda en oposición a las formas A y B, que son diestras, y las nucleobases en el andamio de Z-ADN y Z-ARN están dispuestas espacialmente en una disposición en zigzag (de ahí el prefijo "Z").

Reclutamiento de porciones de ARN de sustrato natural

- 35 Las secuencias de ARNds que no forman Z-ARN que forman estructuras de tallo-bucle y protuberancias también entran en juego como porciones de reclutamiento. Se han descrito en la técnica diversas estructuras de ARNds, con tallo-bucle y no coincidentes o pares de bases oscilantes, distintas de la GluR-B descrita anteriormente con cierto detalle, que interactúan con el dominio de unión de las entidades de edición, como GluR-C y GluR-D, receptores de serotonina 5-HT_{2c} y varios pri y pre-sARNmi y sARNmi. Los bucles preferidos en las porciones de reclutamiento de los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención se ajustan a las secuencias conservadas de tetra o pentabucle UNCG, en la que N puede ser cualquier A, G, C o U, o GCUMA, en la que M es A o C, respectivamente. Cuando la porción de reclutamiento comprende un segmento de tallo-bucle de un sitio de edición de ARN conocido en la técnica, el tallo puede tomarse "tal cual" o puede modificarse en secuencia o longitud, acortarse o modificarse de alguna otra manera, para alterar sus características, tales como la afinidad por la enzima de edición de ARN, o por razones de fabricación o manipulación, coste o cualquier otra razón, siempre que la función de reclutamiento no se vea afectada por completo. Estas estructuras se pueden hacer fácilmente in vitro y probar su capacidad para unirse, reclutar y redirigir entidades de edición. Se conocen varias entidades de edición en la técnica que pueden obtenerse comercialmente, incluyendo hADAR, y probarse en ensayos para la unión a estructuras de ARNds o ADNds en constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Dichos ensayos están fácilmente disponibles para aquellos que tienen habilidades ordinarias en el arte de las interacciones proteína-ácido nucleico, e incluyen un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA).

- 55 Dos ejemplos de secuencias de ARN editadas conocidas que se han caracterizado con gran detalle se encuentran en la subunidad B del receptor de glutamato del subtipo de ácido 3-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) (GluR-B). Este sistema modelo comprende dos sitios editados con frecuencia en los que el AGA codificado por ADN se edita en IGA, dando como resultado una sustitución de arginina a glicina (sitio R/G) y una sustitución distinta de glutamina a arginina (sitio Q/R). Se sabe que el sitio GluR-B (R/G) comprende una estructura de tallo-bucle que consta de 71 nucleótidos que comprenden 3 emparejamientos erróneos, 2 A·C y un par de bases de oscilación G·U. Curiosamente, el bucle consiste en una estructura GCUAA de estructura pentabucle bien conservada que se ajusta a

una secuencia GCUMA conservada filogenéticamente, en la que M es A o C (Aruscavage P.J. and Bass B.L. RNA. 2000; 6: 257-269). Parece haber cierta preferencia por la edición de las dos adenosinas oscilantes, con una eficacia creciente cuando la base opuesta a la adenosina editada se selecciona de citidina o uridina, prefiriéndose la citidina.

Esta estructura puede usarse convenientemente como está, o adaptarse cuando se usa en un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención, como una porción de reclutamiento, reduciendo o aumentando el número de pares de nucleobases oscilantes en el tallo para modificar la especificidad de edición y/o redirigir la edición a los sitios preferidos en la secuencia de ARN diana. Además, o alternativamente, el sitio de reconocimiento de GluR-B para hADAR1 puede modificarse acortando el tallo sin abolir por completo el reconocimiento. Tal acortamiento puede ser conveniente desde la perspectiva de una buena capacidad de fabricación o el coste, y similares.

Un ejemplo de una porción de reclutamiento derivada del dominio GluR-B, que es una realización preferida de acuerdo con la invención, comprende la secuencia: 5'-(AUAN^a)_nUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA(N^bUAU)_n-3', en la que N^a y N^b son cada uno de los nucleótidos individuales que pueden ser A, G, C o U, con la condición de que N^a y N^b formen un par de bases que no coincidan tras la formación de una estructura de tallo-bucle, y n es 1 o 0 (es decir, SEQ ID NOS: 6 y 7).

Otra porción de reclutamiento preferida comprende o consiste en la secuencia 5'-GUGGN^cAUAN^aUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAN^bUAUN^dCCAC-3'(SEQ ID NO: 25), donde: N^a, N^b, N^c y N^d pueden ser un nucleótido A, G, C o U, siempre que N^a y N^b formen un par de bases no coincidentes y N^c y N^d formen un par de bases no coincidentes tras la formación de tallo-bucle; y por el cual el pentanucleótido de gcuaa forma un bucle y las secuencias corriente arriba y corriente abajo adyacentes a gcuaa forman un tallo mediante emparejamiento de bases.

La porción de reclutamiento puede estar unida en el extremo 5' o 3' a una porción de direccionamiento, opcionalmente a través de un enlazador "L", que comprende uno o más nucleótidos, un oligopéptido u otro enlazador químico, tal como polietilenglicol (PEG)

Modificación química de los constructos de oligonucleótidos.

Se conocen diversas químicas y modificaciones en el campo de los oligonucleótidos que pueden usarse fácilmente de acuerdo con la invención. Los enlaces internucleosídicos regulares entre los nucleótidos pueden alterarse mediante mono o ditioación de los enlaces fosfodiéster para producir ésteres de fosforotioato o ésteres de fosforoditioato, respectivamente. Son posibles otras modificaciones de los enlaces internucleosídicos, incluida la amidación y los enlaces peptídicos. El azúcar ribosa puede modificarse mediante la sustitución del resto 2'-O con un alquilo inferior (C1-4, como 2'-O-Me), alquénilo (C2-4), alquínilo (C2-4), metoxietilo (2'-MOE) u otro sustituyente. Los sustituyentes preferidos del grupo 2'OH son un grupo metilo, metoxietilo o 3,3'-dimetilalilo. Este último es conocido por su propiedad de inhibir la sensibilidad a las nucleasas debido a su volumen, mientras mejora la eficiencia de la hibridación (Angus & Sproat FEBS 1993 Vol. 325, No. 1, 2, 123-7). Alternativamente, se pueden aplicar secuencias bloqueadas de ácido nucleico (LNA), que comprenden un puente intramolecular 2'-4' (generalmente un puente de metileno entre el enlace 2' oxígeno y 4' carbono) dentro del anillo de ribosa. Las nucleobases de purina y/o las nucleobases de pirimidina pueden modificarse para alterar sus propiedades, por ejemplo, por aminación o desaminación de los anillos heterocíclicos. La química y los formatos exactos pueden depender de constructo de oligonucleótidos a constructo de oligonucleótidos y de aplicación a aplicación, y pueden elaborarse de acuerdo con los deseos y preferencias de los expertos en la materia.

Longitud

Los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden comprender entre 20 y varios cientos de nucleótidos. Por razones prácticas, como la capacidad de fabricación y el coste, los constructos de oligonucleótidos deben ser preferiblemente más cortos que 200 nucleótidos. Preferiblemente, los constructos de oligonucleótidos tienen entre 20 y 100 nucleótidos de longitud, más preferiblemente entre 24 y 60 nucleótidos, aún más preferiblemente entre 30 y 50 nucleótidos. La porción de direccionamiento del constructo de oligonucleótidos comprende preferiblemente más de 10 nucleótidos, preferiblemente más de 11, 12, 13, 14, 15, 16 aún más preferiblemente más de 17 nucleótidos. Las porciones de direccionamiento más largas proporcionan más especificidad para el sitio diana de la secuencia de ARN que se va por editar, menos efectos fuera de la diana debido a la unión no intencional (fuera de la diana), así como más espacio para crear estructuras secundarias, tales como estructuras de tallo-bucle con porción de direccionamiento en sí mismas, desajustes o bases de oscilación (debido a desajustes con una o más de las bases complementarias en la secuencia de ARN diana en o cerca del sitio por editar), y así sucesivamente. Las porciones de direccionamiento preferidas son complementarias a la secuencia de ARN diana a lo largo de toda la porción de direccionamiento, excepto por la falta de coincidencia opuesta al nucleótido por editar, y opcionalmente una o dos bases oscilantes.

Conformación

Se sabe en la técnica las entidades de edición de ARN, tales como hADAR, editan estructuras de ARNs con especificidad variable, dependiendo de una serie de factores. Un factor importante es el grado de complementariedad de las dos cadenas que forman la secuencia de ARNs. La complementariedad perfecta de las dos cadenas

generalmente hace que el dominio catalítico de hADAR desamine las adenosinas de manera no discriminatoria, reaccionando más o menos con cualquier adenosina que encuentre. La especificidad de hADAR1 se puede aumentar para convertir solo adenosinas particulares asegurando un desajuste en el ARNds, proporcionando una porción de direccionamiento que comprende un desajuste opuesto a la adenosina por editar. El desajuste se crea preferiblemente proporcionando una porción de direccionamiento que tiene una citidina o uridina, lo más preferiblemente una citidina, opuesta a la adenosina por editar. Tras la desaminación de la adenosina en la cadena diana, la cadena diana obtendrá una inosina que, para la mayoría de los procesos bioquímicos, es "leída" por la maquinaria bioquímica de la célula como G. Por lo tanto, después de la conversión de A a I, el desajuste se ha resuelto, porque I es perfectamente capaz de emparejar bases con la C opuesta en la porción de direccionamiento del constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Una vez que se ha resuelto el desajuste debido a la edición, el sustrato se libera y el complejo de entidad de edición de constructo de oligonucleótidos se libera de la secuencia de ARN diana, que luego está disponible para procesos bioquímicos posteriores, como el empalme y la traducción.

El nivel deseado de especificidad de edición de la secuencia de ARN diana puede depender de una aplicación a otra. Siguiendo las instrucciones en la presente solicitud de patente, los expertos en la materia serán capaces de diseñar la porción de direccionamiento del constructo de oligonucleótidos de acuerdo con sus necesidades y, con algo de prueba y error, obtendrán el resultado deseado.

La porción de direccionamiento de los constructos de oligonucleótidos de la invención comprenderá usualmente los nucleótidos normales A, G, U y C, pero también puede incluir inosina (I), por ejemplo, en lugar de uno o más nucleótidos G. En una porción de reclutamiento de un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención, G también puede reemplazarse por una I, aunque debe tenerse cuidado de que una I en el tallo o el bucle no interfiera con la formación de conformaciones de Z-ADN o Z-ARN en aquellas realizaciones donde esto es deseable.

Edición de especificidad

Para evitar la edición no deseada de adenosinas en la secuencia de ARN diana en la región de solapamiento con el constructo de oligonucleótidos, la porción de direccionamiento del constructo de oligonucleótidos puede modificarse químicamente.

Se ha demostrado en la técnica que la 2'-O-metilación del resto ribosilo de un nucleósido opuesto a una adenosina en la secuencia de ARN diana reduce drásticamente la desaminación de esa adenosina por ADAR (Vogel et al. 2014 Angewandte Chemie Int. Ed. 53, 6267-71). Por lo tanto, al incluir los nucleótidos 2'-metoxi (2'-OMe) en la posición deseada del constructo de oligonucleótidos, la especificidad de la edición puede mejorarse dramáticamente. Se prevé que otras sustituciones 2'-O del resto ribosilo, como los grupos 2'-metoxietilo (2'-MOE) y 2'-O-dimetilalilo también pueden reducir la edición no deseada de la adenosina (opuesta) correspondiente en la secuencia diana de ARN. Otras modificaciones químicas están fácilmente disponibles para la persona que tenga una habilidad ordinaria en la técnica de síntesis y diseño de oligonucleótidos. La síntesis de tales constructos de oligonucleótidos modificados químicamente y su prueba en procedimientos de acuerdo con la invención no plantea una carga indebida y la presente invención abarca otras modificaciones.

Entidades de edición

La entidad de edición de ARN de la invención es una enzima de edición de ARN. Las enzimas de edición generalmente serán de naturaleza proteica, como las enzimas ADAR que se encuentran en los metazoos, incluidos los mamíferos. Las enzimas de edición también pueden comprender complejos de ácido(s) nucleico(s) y proteínas o péptidos, tales como ribonucleoproteínas. Las enzimas de edición pueden comprender o consistir solo en ácido(s) nucleico(s), tales como ribozimas. Todas estas enzimas de edición están abarcadas por la presente invención, siempre que sean reclutadas por los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la enzima de edición es una adenosina desaminasa o una citidina desaminasa, aún más preferiblemente una adenosina desaminasa. Cuando la enzima de edición es una adenosina desaminasa, Y es preferiblemente una citidina o una uridina, lo más preferiblemente una citidina. Los de mayor interés son los ADAR humanos, hADAR1 y hADAR2, incluidas las isoformas de los mismos, como hADAR1 p110 y p150.

Las enzimas de edición de ARN conocidas en la técnica, para las cuales pueden construirse convenientemente constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención, incluyen las adenosina desaminasas que actúan sobre el ARN (ADAR), tales como hADAR1 y hADAR2 en humanos o células humanas y citidina desaminasas. El ADAR3 humano (hADAR3) se ha descrito en la técnica anterior, pero según se informa no tiene actividad desaminasa.

Se sabe que hADAR1 existe en dos isoformas; una versión larga inducible por interferón de 150 kDa y una versión más corta, de 100 kDa, que se produce a través del empalme alternativo de un pre-ARNm común. Curiosamente, solo la isoforma más larga es capaz de unirse a la estructura de Z-ADN que puede estar comprendida en la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención. En consecuencia, el nivel de la isoforma de 150 kDa presente en la célula puede verse influenciado por el interferón, particularmente el interferón gamma (IFN-gamma). hADAR1 también es inducible por TNF-alfa. Esto proporciona una oportunidad para desarrollar una terapia combinada, mediante la cual los constructos de interferón-gamma o TNF-alfa y oligonucleótido que comprenden Z-ADN como porción de reclutamiento de acuerdo con la invención se administran a un paciente como un producto

combinado, o como productos separados, ya sea simultánea o posteriormente, en cualquier orden. Ciertas condiciones de la enfermedad ya pueden coincidir con un aumento de los niveles de IFN-gamma o TNF-alfa en ciertos tejidos de un paciente, creando nuevas oportunidades para hacer que la edición sea más específica para los tejidos enfermos.

Tanto la porción de direccionamiento como la porción de reclutamiento pueden comprender o consistir en nucleótidos que tienen modificaciones químicas que alteran la resistencia a la nucleasa, alteran la afinidad de unión (expresada como temperatura de fusión) u otras propiedades. Ejemplos de modificaciones químicas son modificaciones del resto de azúcar, incluso mediante la reticulación de sustituyentes dentro del resto de azúcar (ribosa) (por ejemplo, como en LNA o ácidos nucleicos bloqueados), mediante la sustitución del átomo de grupos 2'-O con alquilo (por ejemplo, 2'-O-metilo), alquínilo (2'-O-alquínilo), alquénilo (2'-O-alquénilo), alcoxialquilo (por ejemplo, metoxietilo, 2'-MOE), que tienen una longitud como se especifica anteriormente, y similares. Además, el grupo fosfodiéster del esqueleto puede modificarse por tioación, ditioación, amidación y similares para producir enlaces internucleosídicos fosforotioato, fosforditioato, fosforamidato, etc. Los enlaces internucleotídicos pueden reemplazarse total o parcialmente por enlaces peptídicos para producir secuencias de ácido peptidónucleico y similares. Alternativamente, o, además, las nucleobases pueden modificarse por (des)aminación, para producir inosina o 2'6'-diaminopurinas y similares.

Una modificación adicional puede ser la metilación de C5 en el resto de citidina del nucleótido, para reducir las propiedades inmunogénicas potenciales que se sabe que están asociadas con secuencias de CpG.

La arquitectura de los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede variar desde horquillas de "una pata" (Figura 1 y 2), hasta horquillas de "dos patas" (Figura 3), en virtud de lo cual las patas comprenden la porción o porciones de direccionamiento, y el cuerpo o núcleo de la horquilla proporciona la porción de reclutamiento (Figuras 1-3). La pata o patas del constructo de oligonucleótidos proporcionarán nucleobases que no coinciden u oscilan y que representan el sitio opuesto del sitio de edición, por ejemplo, una adenosina o citidina por editar, en el ARN diana. Por ejemplo, en caso de que el constructo oligonucleotídico reclute actividad ADAR, para editar una conversión de A a I en el ARN diana, la falta de coincidencia o oscilación puede comprender una adenosina, una guanina, una uridina o un residuo de citidina, preferiblemente un residuo de citidina. Excepto por el desajuste o la oscilación opuesto al sitio de edición, la porción de direccionamiento generalmente será perfectamente complementaria del ARN diana, aunque puede permitirse un número limitado de coincidencias imperfectas, como la oscilación o las bases de desajuste, sin afectar inaceptablemente la especificidad y/o la fuerza de unión entre el constructo de oligonucleótidos y la secuencia de ARN diana. El tallo de la horquilla puede consistir en un tramo de nucleótidos perfectamente complementario, formando una estructura de ARN de doble cadena en toda su longitud. Alternativamente, el tallo de la horquilla puede comprender uno o más nucleótidos opuestos oscilantes o no coincidentes, siempre que el reconocimiento del constructo oligonucleotídico por la actividad de edición no se vea inaceptablemente afectado. Debe entenderse que el funcionamiento de la actividad de edición en la célula en sus sitios de edición naturales puede reducirse como consecuencia del reclutamiento de las entidades responsables de la actividad de edición por los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Una persona con conocimientos ordinarios en la materia entenderá que la medida en que las entidades de edición dentro de la célula se redirigen a otros sitios diana puede regularse variando la afinidad de la porción de reclutamiento de los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención para el dominio de reconocimiento de la enzima de edición. Esto se puede hacer reduciendo la afinidad de la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos para la enzima de edición a través de una o una combinación de formas, incluso cambiando la secuencia del tallo, el tamaño o la estructura (secuencia, química del andamio, ribosilo, o nucleobase) del bucle o una combinación de ambos. La modificación exacta puede determinarse mediante algún ensayo y error y/o mediante procedimientos computacionales basados en interacciones estructurales entre la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos y el dominio de reconocimiento de la enzima de edición.

Además, o alternativamente, el grado de reclutamiento y redireccionamiento de la enzima de edición residente en la célula puede regularse por la dosificación y el régimen de dosificación del constructo oligonucleotídico. Esto es algo que debe determinar el experimentador (in vitro) o el médico clínico, generalmente en ensayos clínicos de fase I y/o II.

Preferiblemente, la invención proporciona el uso de un constructo de oligonucleótidos que consiste en un solo oligonucleótido (Figura 1, Figura 2A, Figura 3) que comprende tanto la porción de direccionamiento como la porción de reclutamiento para editar secuencias de ácido nucleico. Sin embargo, un constructo de oligonucleótidos que comprende el uso de dos oligonucleótidos (Figura 2B), por ejemplo, uno que comprende la porción de direccionamiento y otro que comprende la porción de reclutamiento, está ciertamente dentro del ámbito de la presente invención. Por lo tanto, de acuerdo con otra realización, la invención proporciona dos oligonucleótidos separados, uno que comprende la porción de direccionamiento y el otro que comprende la porción de reclutamiento, por lo que los dos oligonucleótidos están diseñados de tal manera que tienen afinidad entre sí, por ejemplo, mediante el emparejamiento de bases antisentido de Watson-Crick entre las dos porciones funcionales o de una secuencia sin una función específica de selección o reclutamiento, por ejemplo, una secuencia enlazadora. Tal sistema de dos componentes puede tener ventajas en términos de flexibilidad, adaptabilidad (por ejemplo, dentro del contexto de la medicina personalizada), capacidad de fabricación, coste de los bienes u otros. Los dos (o más) oligonucleótidos de acuerdo con el sistema multicomponente no necesariamente tienen que separar estrictamente las diferentes funciones (focalización y reclutamiento). Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden dar lugar a la función de selección y reclutamiento solo después de ensamblarse en un complejo. En caso de que los dos oligonucleótidos se hibridan, formando una porción

de ARNs, en realidad pueden crear la función de reclutamiento tras la fusión. La fusión es una manera de formar un complejo, pero quedará claro que hay otras formas por las cuales dos (o más) componentes oligonucleotídicos pueden unirse, amalgamando el objetivo y la función de reclutamiento. Los constructos de oligonucleótidos que comprenden más de dos oligonucleótidos no están excluidas del alcance de la presente invención, aunque a mayor número de oligonucleótidos por constructo, más complejo es el sistema en términos de fabricación, análisis, formulación, administración u otros aspectos de manipulación, incluida la logística y los costes.

La célula de mamífero

La invención se refiere a la modificación de secuencias de ARN diana en células eucariotas, preferiblemente de metazoos, más preferiblemente células de mamífero. En principio, la invención se puede usar con células de cualquier especie de mamífero, pero se usa preferiblemente con una célula humana.

Los constructos de oligonucleótidos de la invención se pueden usar con células de cualquier órgano, por ejemplo, piel, pulmón, corazón, riñón, hígado, páncreas, intestino, músculo, glándula, ojo, cerebro, sangre y similares. La invención es particularmente adecuada para modificar secuencias en células, tejidos u órganos implicados en un estado enfermo de un sujeto (humano). Dichas células incluyen, entre otras, células epiteliales del pulmón o del tracto gastrointestinal, células de los órganos reproductivos, células musculares, células del ojo, células de la piel, células de tejidos y órganos como el hígado, los riñones, el páncreas, células inmunes, células cancerosas, células de glándulas, células cerebrales y similares.

Los constructos de oligonucleótidos de la invención también se pueden usar con células de mamífero que no están presentes de forma natural en un organismo, por ejemplo, con una línea celular o con una célula madre embrionaria (ES).

Los constructos de oligonucleótidos de la invención se pueden usar con diversos tipos de células madre, incluyendo células madre pluripotentes, células madre totipotentes, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, etc.

La célula puede localizarse in vitro o in vivo. Una ventaja de los constructos de oligonucleótidos de la invención es que pueden usarse con células in situ en un organismo vivo, pero también pueden usarse con células en cultivo. En algunas realizaciones, las células se tratan ex vivo y luego se introducen en un organismo vivo (por ejemplo, se reintroducen en un organismo del que se derivaron originalmente).

Los constructos de oligonucleótidos de la invención también pueden usarse para editar secuencias de ARN diana en células dentro de un denominado organoide. Los organoides pueden considerarse como tejidos tridimensionales derivados in vitro, pero se manejan utilizando condiciones específicas para generar tejidos individuales aislados (por ejemplo, véase Lancaster and Knoblich, Science 2014, vol. 345 No. 6194 1247125). En un entorno terapéutico, son útiles porque pueden derivarse in vitro de las células de un paciente, y los organoides pueden reintroducirse en el paciente como material autólogo que es menos probable que sea rechazado que un trasplante normal. Por lo tanto, de acuerdo con otra realización preferida, los oligonucleótidos de la invención pueden usarse en organoides cultivados a partir de muestras de tejido tomadas de un paciente (por ejemplo, de su tracto gastrointestinal; véase Sala et al. J Surg Res. 2009; 156(2): 205-12, y también Sato et al. Gastroenterology 2011; 141: 1762-72); tras la edición de ARN de acuerdo con la invención, los organoides, o células madre que residen dentro de los organoides, se pueden usar para trasplantar nuevamente al paciente para mejorar la función del órgano.

La célula por tratar generalmente tendrá una mutación genética. La mutación puede ser heterocigótica u homocigótica. Los oligonucleótidos de la invención se usarán típicamente para modificar mutaciones puntuales, tales como mutaciones N a A, en la que N puede ser G, C, U (en el nivel de ADN T), preferiblemente mutaciones G a A, o mutaciones N a C, en la que N puede ser A, G, U (en el nivel de ADN T), preferiblemente mutaciones de U a C. Los genes que contienen mutaciones de particular interés se analizan a continuación. Sin embargo, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos de la invención se usan de manera opuesta al introducir una mutación asociada a la enfermedad en una línea celular o un animal, con el fin de proporcionar una herramienta de investigación útil para la enfermedad en cuestión. Como ejemplo de creación de un modelo de enfermedad, hemos proporcionado una secuencia de oligonucleótidos que permite el reclutamiento de la actividad de edición en una célula humana para crear una mutación en el gen CEP290, creando un sitio de empalme críptico que forma la base de una forma de amaurosis de Leber congénita, la forma más común de ceguera infantil congénita.

Una mutación que se revertirá mediante la edición de ARN puede haber surgido a nivel del cromosoma o alguna otra forma de ADN, como el ADN mitocondrial o ARN, que incluye pre-ARNm, ARN ribosómico o ARN mitocondrial. Un cambio para realizar puede ser en un ARN diana de un patógeno, incluidos hongos, levaduras, parásitos, cinetoplastidos, bacterias, fagos, virus, etc., con los cuales la célula o el sujeto ha sido infectado. Posteriormente, la edición puede tener lugar a nivel de ARN en una secuencia diana dentro de dicha célula, sujeto o patógeno. Ciertos patógenos, como los virus, liberan su ácido nucleico, ADN o ARN, en la célula del huésped infectado (célula). Otros patógenos residen o circulan en el huésped infectado. Los constructos de oligonucleótidos de la invención pueden usarse para editar secuencias de ARN diana que residen en una célula del huésped eucariota infectado, o para editar una secuencia de ARN dentro de la célula de un patógeno que reside o circula en el huésped eucariota, siempre que

las células donde la edición se llevará a cabo contiene una enzima de edición compatible con el constructo de oligonucleótidos administrado a las mismas.

- 5 Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la edición de ARN a través de hADAR1 y hADAR2 tiene lugar en pre-ARNm en el núcleo, durante la transcripción o el empalme. Se cree que la edición de ARN por citidina desaminasas tiene lugar a nivel de ARNm. No se excluye la edición de codones de ARN mitocondriales o secuencias no codificantes en ARNm maduros.

La secuencia diana y el cambio

- 10 Los constructos de oligonucleótidos de la invención se pueden usar para hacer un cambio en una secuencia de ARN diana en una célula eucariota mediante el uso de un constructo de oligonucleótidos que es capaz de direccionar a un sitio para editar y reclutar entidades de edición de ARN residentes en la célula para provocar las reacciones de edición. Las reacciones de edición preferidas son las desaminaciones de adenosina y las desaminaciones de citidina, que convierten las adenosinas en inosinas y las citidinas en uridinas, respectivamente. Los cambios pueden ser en regiones no traducidas de 5' o 3' de un ARN diana, en sitios de empalme (crípticos), en exones (aminoácidos que cambian en la proteína traducida del ARN diana, uso de codones o comportamiento de empalme cambiando
- 15 silenciadores o potenciadores de empalme exónico), mediante la introducción o eliminación de codones de inicio o detención), en intrones (cambio de empalme alterando silenciadores de empalme intrónico o potenciadores de empalme intrónico, puntos de ramificación) y en general en cualquier región que afecte la estabilidad, estructura o funcionamiento del ARN. La secuencia de ARN diana puede comprender una mutación que se desee corregir o alterar, tal como una transición o una transversión. Alternativamente, la secuencia de ARN diana es mutada deliberadamente
- 20 para crear un fenotipo alterado (o genotipo, en el caso de organismos basados en ARN, como virus de ARN), donde antes no había mutación. Por ejemplo, se pueden hacer líneas celulares o animales que transportan cambios (mutaciones) en una secuencia de ARN diana, que se pueden usar en ensayos o como sistemas modelo (animales, organoides, etc.) para estudiar enfermedades, probar compuestos experimentales contra enfermedades y similares. Los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden usarse en sistemas de detección de alto
- 25 rendimiento (en formato ordenado) para hacer bancos de células con una gran variedad de ARN diana, por ejemplo, codificar una gran variedad de isoformas de proteínas, para experimentación adicional, incluida la detección de compuestos, ingeniería de proteínas y similares.

El ARN diana puede ser cualquier secuencia de ARN celular o viral, pero es más generalmente un pre-ARNm o un ARNm con una función de codificación de proteínas.

- 30 Solo por facilidad de referencia, y sin la intención de limitar la invención, se proporciona la siguiente tabla para ilustrar los posibles cambios en el codón que pueden producirse mediante la edición de adenosina desaminasa dirigida por los oligonucleótidos de la invención. La tabla en particular no debe interpretarse como una limitación de la aplicabilidad de la invención para codificar secuencias en cualquier ARN; como ya se señaló, la invención se puede practicar en cualquier diana de ARN que comprenda una adenosina, ya sea en una región codificante, un intrón, un exón no
- 35 codificante (como una región no traducida 5' o 3'), en ARNm, sARNt, ARNr, etc. Para evitar cualquier malentendido sobre la amplitud de la aplicabilidad, los cambios que son intrascendentes ('silenciosos') desde una perspectiva de codificación aún pueden alterar la expresión génica de una determinada proteína, ya que algunos codones para el mismo aminoácido pueden ser más preferidos que otros y pueden conducir, por ejemplo, a una estabilidad de transcripción o eficiencia de traducción diferente, haciendo que la proteína codificada se vuelva más o menos
- 40 abundante que sin el cambio.

Codón diana	Aminoácidos	Codón corregido	Aminoácidos
AAA	Lys	GAA	Glu
		AGA	Arg
		AAG	Lys
		GGA	Gly
		AGG	Arg
		GAG	Glu
		GGG	Gly
AAC	Asn	GAC	Asp
		AGC	Ser
		GGC	Gly
AAG	Lys	GAG	Glu
		AGG	Arg
		GGG	Gly
AAU	Arg	GAU	Asp
		AGU	Ser
		GGU	Gly
ACA	Thr	GCA	Ala
		ACG	Thr
		GCG	Ala
ACC	Thr	GCC	Ala
ACG	Thr	GCG	Ala
ACU	Thr	GCU	Ala
AGA	Arg	GGA	Gly
		AGG	Arg
		GGG	Gly
AGC	Ser	GGC	Gly
AGG	Arg	GGG	Gly
AGU	Ser	GGU	Gly
AUA	Ile	GAU	Asp
		AUG	Met
		GUG	Val
AUC	Ile	GUC	Val
AUG	Met	GUG	Val
AUU	Ile	GUU	Val
CAA	Gln	CGA	Arg
		CAG	Gln
		CGG	Arg

(continuación)

Codón diana	Aminoácidos	Codón corregido	Aminoácidos
CAC	His	CGC	Arg
CAG	Gln	CGG	Arg
CAU	His	CGU	Arg
CCA	Pro	CCG	Pro
CGA	Arg	CGG	Arg
CUA	Leu	CUG	Leu
GAA	Glu	GGA	Gly
		GAG	Glu
		GGG	Gly
GCA	Ala	GCG	Ala
GUA	Val	GUG	Val
GGA	Gly	GGG	G ly
GAC	Asp	GGC	Gly
GAG	Glu	GGG	Gly
GAU	Asp	GGU	Gly
UAA	Detención	UGA	Detención
		UAG	Detención
		UGG	Trp
UCA	Ser	UCG	Ser
UGA	Detención	UGG	Trp
UUA	Leu	UUG	Leu
UAC	Tyr	UGC	Cys
UAG	Detención	UGG	Trp
UAU	Tyr	UGU	Cys

Las adenosinas diana particularmente interesantes para editar usando oligonucleótidos de acuerdo con la invención son aquellas que son parte de codones para residuos de aminoácidos que definen funciones o características clave, tales como sitios catalíticos, sitios de unión para otras proteínas, unión por sustratos, dominios de localización, para modificación co- o postraduccion, como la glicosilación, hidroxilación, miristoilación, escisión de proteínas por proteasas (para madurar la proteína y/o como parte del enrutamiento intracelular), y así sucesivamente.

Una gran cantidad de enfermedades genéticas son causadas por mutaciones G a A, y estas son enfermedades diana preferidas porque la desaminación de adenosina en la adenosina diana mutada revertirá la mutación a tipo salvaje. Sin embargo, la reversión al tipo salvaje puede no ser siempre necesaria para obtener un efecto beneficioso. La modificación de una A a una G en una diana también puede ser beneficiosa si el nucleótido de tipo salvaje es distinto de una G. En ciertas circunstancias, puede predecirse que este sea el caso, en otras puede requerir algunas pruebas. En ciertas circunstancias, la modificación de una A en un ARN diana a G donde el tipo salvaje no es una G puede ser silenciosa (no traducida a un aminoácido diferente), o no consecuente (por ejemplo, un aminoácido es sustituido, pero constituye una sustitución conservadora que no interrumpe la estructura y función de la proteína), o el aminoácido es parte de un dominio funcional que tiene una cierta robustez para el cambio. Si la transición de A a G provocada por la edición de acuerdo con la invención es en un ARN no codificante, o en una parte no codificante de un ARN, la consecuencia también puede ser intrascendente o menos grave que la mutación original. Los expertos en la materia entenderán que la aplicabilidad de los constructos de oligonucleótidos de la presente invención es muy amplia y ni siquiera se limita a prevenir o tratar enfermedades. Los constructos de oligonucleótidos de la invención también pueden usarse para modificar transcripciones para estudiar el efecto de las mismas, incluso si, o particularmente

cuando, dicha modificación induce un estado de enfermedad, por ejemplo, en una célula o un modelo animal no humano.

Ejemplos preferidos de enfermedades genéticas que pueden prevenirse y/o tratarse con oligonucleótidos de acuerdo con la invención son cualquier enfermedad en la que la modificación de una o más adenosinas en un ARN diana provocará un cambio (potencialmente) beneficioso.

Las secuencias de ARN transcritas que son secuencias de ARN diana potenciales de acuerdo con la invención, que contienen mutaciones de particular interés incluyen, pero no se limitan a las transcritas del gen CFTR (el regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística), distrofina, huntingtina, neurofibromina 1, neurofibromina 2, la cadena de hemoglobina β -globina, CEP290 (proteína centrosómica 290kDa), el gen HEXA de la β -hexosaminidasa A y cualquiera de los genes Usher (por ejemplo, USH2B que codifica la usherina) responsable de una forma de ceguera genética llamada Síndrome de Usher. Una lista más extensa se presenta más abajo. La secuencia diana se seleccionará en consecuencia, y el constructo de oligonucleótidos incluirá la modificación deseada para corregir la mutación.

Los expertos en la técnica de las mutaciones CF reconocen que se conocen entre 1000 y 2000 mutaciones en el gen CFTR, que incluyen R117H, G542X, G551D, R553X, W1282X y N1303K.

En general, las mutaciones en cualquier ARN diana que puede revertirse usando constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención son mutaciones G a A, en el caso del reclutamiento de adenosina desaminasa, y mutaciones U a C en el caso del reclutamiento de citidina desaminasa, y los constructos de oligonucleótidos pueden diseñarse en consecuencia. Las mutaciones que pueden dirigirse usando constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención también incluyen C a A, U a A (T a A en el nivel de ADN) en el caso de reclutar adenosina desaminasas, y mutaciones de A a C y de G a C en el caso de reclutamiento de citidina desaminasas. Aunque la edición de ARN en las últimas circunstancias no necesariamente revierte la mutación a tipo salvaje, el nucleótido editado puede dar lugar a una mejora con respecto a la mutación original. Por ejemplo, una mutación que causa un codón de detención en el marco, que da lugar a una proteína truncada, tras la traducción, puede transformarse en un codón que codifica un aminoácido que puede no ser el aminoácido original en esa posición, pero que da lugar a una proteína (de longitud completa) con al menos alguna funcionalidad, al menos más funcionalidad que la proteína truncada.

La secuencia diana es endógena a la célula eucariota, preferiblemente de mamífero, más preferiblemente humana. Por lo tanto, la secuencia diana no es, por ejemplo, un transgén o un gen marcador que se ha introducido artificialmente en algún momento de la historia de la célula, sino que es un gen que está naturalmente presente en la célula (ya sea en forma mutante o no mutante).

Los constructos de oligonucleótidos de la invención no se limitan a corregir mutaciones, ya que en cambio puede ser útil cambiar una secuencia de tipo salvaje en una secuencia mutada mediante la aplicación de oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Un ejemplo en el que puede ser ventajoso modificar una adenosina de tipo salvaje es provocar la omisión de un exón, por ejemplo, modificando una adenosina que resulta ser un sitio de ramificación requerido para empalmar dicho exón. Otro ejemplo es donde la adenosina define o es parte de una secuencia de reconocimiento para la unión a proteínas, o está implicada en una estructura secundaria que define la estabilidad del ARNm. Como se señaló anteriormente, por lo tanto, la invención puede usarse para proporcionar herramientas de investigación para enfermedades, para introducir nuevas mutaciones que son menos perjudiciales que una mutación existente, etc.

Aplicaciones de los constructos de oligonucleótidos

La cantidad de constructos de oligonucleótidos por administrar, la dosificación y el régimen de dosificación pueden variar de un tipo de célula a otro, la enfermedad por tratar, la población objetivo, el modo de administración (por ejemplo, sistémico versus local), la gravedad de enfermedad y el nivel aceptable de actividad secundaria, pero estos pueden y deben evaluarse por ensayo y error durante la investigación in vitro, en ensayos preclínicos y clínicos. Los ensayos son particularmente directos cuando la secuencia modificada conduce a un cambio fenotípico fácilmente detectable. Es posible que dosis más altas de oligonucleótidos puedan competir por unirse a una entidad de edición de ácido nucleico (por ejemplo, ADAR) dentro de una célula, agotando así la cantidad de la entidad que es libre de participar en la edición de ARN, pero los ensayos de dosificación de rutina revelarán tales efectos para un oligonucleótido dado y una diana dada.

Una técnica de prueba adecuada implica administrar el constructo de oligonucleótidos a líneas celulares, o un organismo de prueba y luego tomar muestras de biopsia en varios puntos de tiempo a partir de ese momento. La secuencia del ARN diana se puede evaluar en la muestra de biopsia y se puede seguir fácilmente la proporción de células que tienen la modificación. Después de que esta prueba se haya realizado una vez, se puede retener el conocimiento y se puede realizar la administración futura sin necesidad de tomar muestras de biopsia.

Un procedimiento para usar constructos de oligonucleótidos de la invención puede incluir, por lo tanto, un paso para identificar la presencia del cambio deseado en la secuencia de ARN diana de la célula, verificando así que la secuencia de ARN diana ha sido modificada. Este paso generalmente implicará la secuenciación de la parte relevante del ARN diana, o una copia de ADNc del mismo (o una copia de ADNc de un producto de empalme del mismo, en caso de que

el ARN diana sea un pre-ARNm), como se discutió anteriormente, y el cambio de secuencia se puede verificar fácilmente. Por lo tanto, el cambio se puede verificar fácilmente. Alternativamente, el cambio puede evaluarse en el nivel de la proteína (longitud, glicosilación, función o similar), o mediante alguna lectura funcional, como una corriente (n) (inducible), cuando la proteína codificada por la secuencia del ARN diana es un canal de iones, por ejemplo. En el caso de la función CFTR, un experto en la técnica conoce bien un ensayo de cámara Ussing o una prueba NPD en un mamífero, incluidos los humanos, para evaluar la restauración o la ganancia de la función.

Después de que se haya producido la edición de ARN en una célula, el ARN modificado puede diluirse con el tiempo, por ejemplo, debido a la división celular, la vida media limitada de los ARN editados, etc. Por lo tanto, en términos terapéuticos prácticos, un procedimiento para usar los constructos de oligonucleótidos de la invención puede implicar la administración repetida de un constructo de oligonucleótidos hasta que se hayan modificado suficientes ARN diana para proporcionar un beneficio tangible al paciente y/o mantener los beneficios a lo largo del tiempo.

Administración del constructo oligonucleotídico

Los constructos de oligonucleótidos de la invención son particularmente adecuados para uso terapéutico, por lo que los constructos de oligonucleótidos de la invención pueden proporcionar una composición farmacéutica que comprende un constructo de oligonucleótidos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser simplemente una solución salina. Esta puede ser útil isotónica o hipotónica, particularmente para administración pulmonar.

También se describe un dispositivo de administración (por ejemplo, jeringa, inhalador, nebulizador) que incluye una composición farmacéutica como se describió anteriormente.

La invención también proporciona un constructo de oligonucleótidos de la invención para usar en la edición dirigida al sitio de un nucleótido en un ARN diana en una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero, más preferiblemente una célula humana, mediante la acción de una enzima de ARN naturalmente presente en dicha célula y capaz de realizar la edición de dicho nucleótido. También se describe el uso de un constructo de oligonucleótidos de la invención en la fabricación de un medicamento para realizar un cambio en una secuencia de ARN diana en una célula de mamífero, preferiblemente humana, como se describe en el presente documento.

Formulación, dosificación y modo de administración para uso en terapia.

Los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención se administran adecuadamente en solución acuosa, por ejemplo, solución salina, o en suspensión, que opcionalmente comprende aditivos, excipientes y otros ingredientes, compatibles con el uso farmacéutico, en concentraciones que varían de 1 ng/ml a 1 g/ml, preferiblemente de 10 ng/ml a 500 mg/ml, más preferiblemente de 100 ng/ml a 100 mg/ml. La dosificación puede variar adecuadamente entre aproximadamente 1 µg/kg y aproximadamente 100 mg/kg, preferiblemente entre aproximadamente 10 µg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, más preferiblemente entre aproximadamente 100 µg/kg y aproximadamente 1 mg/kg. La administración puede ser por inhalación (por ejemplo, por nebulización), intranasal, oral, por inyección o infusión, por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica, intracraneal, intramuscular, intratraqueal, intraperitoneal, intrarrectal, mediante inyección directa en un tumor y similares. La administración puede ser en forma sólida, en forma de polvo, píldora o en cualquier otra forma compatible con el uso farmacéutico en humanos.

La invención es particularmente adecuada para el tratamiento de enfermedades genéticas, tales como fibrosis quística, albinismo, deficiencia de alfa-1-antitripsina, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, asma, talasemia β, síndrome de Cadasil, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), atrofia muscular espinal distal (DSMA), distrofia muscular de Duchenne/Becker, epidermolisis ampollosa distrófica, epidermolisis bullosa, enfermedad de Fabry, trastornos asociados al factor V de Leiden, adenomatosa familiar, poliposis, galactosemia, enfermedad de Gaucher, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, hemofilia, hematocromatosis hereditaria, síndrome de Hunter, enfermedad de Huntington, síndrome de Hurler, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome de poliaglutinación hereditaria, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Lynch, síndrome de Marfan, mucopolisacaridosis, distrofia muscular, distrofia miotónica tipos I y II, neurofibromatosis, enfermedad de Niemann-Pick tipo A, B y C, relacionada con cáncer NY-eso1, enfermedad de Parkinson, síndrome de Peutz-Jeghers, fenilcetonuria, enfermedad de Pompe, enfermedad ciliar primaria, trastornos relacionados con la mutación de protrombina, como la mutación de protrombina G20210A, hipertensión pulmonar, retinitis pigmentosa, enfermedad de Sandhoff, síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SCID,) anemia falciforme, atrofia muscular espinal, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Tay-Sachs, síndrome de Usher, inmunodeficiencia ligada al cromosoma X, diversas formas de cáncer (por ejemplo, BRCA1 y 2 vinculan el cáncer de mama y el cáncer de ovario), y similares.

El constructo de oligonucleótidos puede administrarse sistémicamente, pero es más típico administrar un constructo de oligonucleótidos a células en las que se ve el fenotipo de la secuencia diana. Por ejemplo, las mutaciones en CFTR causan fibrosis quística que se observa principalmente en el tejido epitelial pulmonar, por lo que con una secuencia diana de CFTR se prefiere administrar el constructo oligonucleotídico específicamente y directamente a los pulmones. Esto se puede lograr convenientemente por inhalación, por ejemplo, de un polvo o aerosol, típicamente mediante el uso de un nebulizador. Especialmente preferidos son los nebulizadores que usan una denominada malla vibratoria,

que incluye el PARI eFlow (Rapid) o el i-neb de Respironics. Los inventores han descubierto que el uso inhalado de constructos de oligonucleótidos puede conducir a una distribución sistémica del constructo de oligonucleótidos y la absorción por las células en los tejidos del intestino, hígado, páncreas, riñón y glándulas salivales, entre otros. Por lo tanto, es de esperar que el suministro inhalado de constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención también pueda atacar estas células de manera eficiente, lo que en el caso de la orientación del gen CFTR podría conducir a la mejora de los síntomas gastrointestinales también asociados con la fibrosis quística. Para otras secuencias diana, dependiendo de la enfermedad y/o el órgano diana, la administración puede ser tópica (por ejemplo, en la piel), por inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, oral, ocular, etc.

En algunas enfermedades, la capa de moco muestra un grosor aumentado, lo que conduce a una disminución de la absorción de medicamentos a través del pulmón. Una de esas enfermedades es la bronquitis crónica, otro ejemplo es la fibrosis quística. Existen diversas formas de normalizadores de moco, como ADNasas, solución salina hipertónica o manitol, que está disponible comercialmente bajo el nombre de Bronchitol. Cuando los normalizadores de moco se usan en combinación con constructos de oligonucleótidos de edición de ARN, tales como los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención, pueden aumentar la efectividad de esos medicamentos. Por consiguiente, la administración de un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, se combina preferiblemente con normalizadores de moco, preferiblemente aquellos normalizadores de moco descritos aquí. Además, la administración de los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención se puede combinar con la administración de una molécula pequeña para el tratamiento de la FQ, como los compuestos potenciadores, por ejemplo, Kalydeco (ivacaftor; VX-770), o los compuestos correctores, por ejemplo VX-809 (lumacaftor) y/o VX-661. Otras terapias de combinación en CF pueden comprender el uso de un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención en combinación con un inductor de adenosina desaminasa, usando IFN-gamma o TNF-alfa.

Como alternativa, o en combinación con los normalizadores de moco, se puede aplicar el suministro de partículas o nanopartículas penetrantes al moco para el suministro eficiente de moléculas de edición de ARN a células epiteliales de, por ejemplo, pulmón e intestino. En consecuencia, la administración de un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, preferiblemente utiliza la administración en partículas o nanopartículas penetrantes al moco.

Las infecciones pulmonares crónicas y agudas a menudo están presentes en pacientes con enfermedades tales como fibrosis quística. Los tratamientos con antibióticos reducen las infecciones bacterianas y los síntomas de aquellos como el engrosamiento de la mucosidad y/o la formación de biopelículas. El uso de antibióticos en combinación con constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención podría aumentar la eficacia de la edición de ARN debido al acceso más fácil de las células diana para el constructo de oligonucleótidos. Por consiguiente, la administración de un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, se combina preferiblemente con un tratamiento con antibióticos para reducir las infecciones bacterianas y los síntomas de aquellos tales como el engrosamiento de moco y/o la formación de biopelículas. Los antibióticos pueden administrarse sistémicamente o localmente o ambos.

Para la aplicación, por ejemplo, en pacientes con fibrosis quística, los constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención, o los constructos de oligonucleótidos empaquetados o complejos de acuerdo con la invención pueden combinarse con cualquier normalizador de moco tal como una ADNasa, manitol, solución salina hipertónica y/o antibióticos y/o una molécula pequeña para el tratamiento de la FQ, como compuestos potenciadores, por ejemplo, ivacaftor, o compuestos correctores, por ejemplo, lumacaftor y/o VX-661.

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

En una realización preferida, la invención también proporciona un constructo de oligonucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3:

GFP SEQ ID NO: 1 5'-cgcgcggttttcgcgcg**GCUGAAC*****CACUGCAC**-3'

CEP290 SEQ ID NO: 2 5'-cgcgcggttttcgcgcg**GAGAUAC*****UCACAAUU**-3'

CFTR SEQ ID NO: 3 5'-cgcgcggttttcgcgcg**CGUUGAC*****CUCCACUC**-3' Secuencia correspondiente SEQ ID NO: 9 G551D ARNm 3'-GCAACUA*GAGGUGAG-5'

letras minúsculas = ADN con propensión a formar estructura de ADN Z

Negrita subrayada = 2'-O-metilo

Cursiva = enlaces internucleosídicos de fosforotioato y 2'-O-metilo

C*=base opuesta a la adenosina diana por editar

De manera similar, en una realización preferida, la invención también proporciona un constructo de oligonucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 16 a 22 (y opcionalmente las modificaciones nucleicas descritas en el Ejemplo 1 para tales secuencias de nucleótidos) o cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 28, 38, 39, 40 y 41 (y opcionalmente las modificaciones nucleicas descritas en los Ejemplos 2-5 para tales secuencias de nucleótidos).

General

Los términos "adenina", "guanina", "citosina", "timina", "uracilo" e hipoxantina (la nucleobase en 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.

El término nucleótido se refiere a la nucleobase-(desoxi)ribosil-fosfoenlazante respectiva, así como a cualquier modificación química del resto ribosa o del grupo fosfo. Por lo tanto, el término incluiría un nucleótido que incluye un resto de ribosilo bloqueado (que comprende un puente 2'-4', que comprende un grupo metileno o cualquier otro grupo, bien conocido en la técnica), un nucleótido que incluye un enlazador que comprende un fosfodiéster, fosfotriéster, fósforo(di)tioato, metilfosfonatos, enlazadores de fosforamido y similares.

A veces, los términos adenosina y adenina, guanosina y guanina, citosina y citidina, uracilo y uridina, timina y timidina, inosina e hipoxantina, se usan indistintamente para referirse a la nucleobase, nucleósido o nucleótido correspondiente.

A veces los términos nucleobase, nucleósido y nucleótido se usan indistintamente, a menos que el contexto claramente requiera algo diferente.

Siempre que se hace referencia a un "oligonucleótido", se entienden tanto oligorribonucleótidos como desoxioligorribonucleótidos a menos que el contexto indica lo contrario. Siempre que se haga referencia a un oligorribonucleótido, puede comprender las bases A, G, C, U o I. Siempre que se haga referencia a un desoxioligorribonucleótido, puede comprender las bases A, G, C, T o I.

Siempre que se haga referencia a nucleótidos en el constructo de oligonucleótidos, como citosina, se incluyen 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina y β -D-glucosil-5-hidroximetilcitosina; cuando se hace referencia a adenina, se incluyen 6-metiladenina y 7-metiladenina; cuando se hace referencia a uracilo, se incluyen dihidrouracilo, 4-tiouracilo y 5-hidroximetiluracilo; cuando se hace referencia a guanina, se incluye 1-metilguanina.

Siempre que se hace referencia a nucleósidos o nucleótidos, también se incluyen derivados de ribofurano, tales como 2'-desoxi, 2'-hidroxi y variantes sustituidas con 2'-O, como 2'-O-metilo. como otras modificaciones, incluidas las variantes puenteadas de 2'-4'.

Siempre que se hace referencia a oligonucleótidos, los enlaces entre dos mononucleótidos pueden ser enlaces de fosfodiéster, así como modificaciones de los mismos, que incluyen fosfodiéster, fosfotriéster, fosforo(di)tioato, metilfosfonato, enlaces de fosforamido y similares.

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea relevante, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "corriente abajo" en relación con una secuencia de ácido nucleico significa adicionalmente a lo largo de la secuencia en la dirección 3'; el término "corriente arriba" significa lo contrario. Por lo tanto, en cualquier secuencia que codifique un polipéptido, el codón de inicio está corriente arriba del codón de detención en la cadena de sentido, pero está corriente abajo del codón de detención en la cadena antisentido.

Las referencias a "hibridación" típicamente se refieren a hibridación específica y excluyen la hibridación no específica. La hibridación específica puede ocurrir en condiciones experimentales elegidas, usando técnicas bien conocidas en el arte, para asegurar que la mayoría de las interacciones estables entre la sonda y la diana es donde la sonda y la diana tienen al menos 70 %, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente a identidad de secuencia de al menos 90 %.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Boceto de una secuencia de ARN diana y un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención; A: el constructo oligonucleotídico está diseñado como un constructo oligonucleotídico único de "una pata", con la porción de direccionamiento en su extremo 3' y la porción de reclutamiento en su extremo 5'. B: el constructo oligonucleotídico está diseñado como un constructo oligonucleotídico único de "una pata", con la porción de direccionamiento en su extremo 5' y la porción de reclutamiento en su extremo 3'; la entidad de edición se representa como una estructura gris, que representa el dominio de reconocimiento en el lado izquierdo y el dominio catalítico en el lado derecho, lo que indica la reacción de desaminación (rayo) en el sitio diana.

Figura 2: Boceto de la estructura de ARN diana con el constructo de oligonucleótidos: A muestra el constructo de oligonucleótidos con un enlazador entre la porción de direccionamiento y la porción de reclutamiento; B muestra la realización en la que el constructo de oligonucleótidos comprende dos secuencias de oligonucleótidos, no unidas covalentemente, que interactúan a través del emparejamiento de bases antisentido de Watson-Crick por sus respectivos segmentos 3'.

Figura 3: Boceto de la estructura de ARN diana con el constructo oligonucleotídico en su formato de "dos patas", donde la porción diana está separada (o "dividida") por la porción de reclutamiento; A muestra el sitio de edición corriente arriba en la secuencia de ARN diana, en relación con la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos; B muestra el sitio de edición corriente abajo en la secuencia de ARN de direccionamiento, en relación con la porción de reclutamiento del constructo de oligonucleótidos.

Figura 4: Microscopía de fluorescencia de pocillos que muestran fluorescencia verde en células HeLa después de la transfección de lipofectamina con pGFPstop57 y los oligonucleótidos indicados, excepto: el panel superior izquierdo es células no tratadas; los cuatro paneles inferiores son controles que no recibieron al menos uno de los componentes indicados. Las figuras 4a y 4b difieren solo por contraste.

Figura 5: Microscopía de fluorescencia de pocillos que muestran fluorescencia verde en células HeLa después de la transfección de lipofectamina con pGFPstop57, pADAR2 y oligonucleótido #11 en varias proporciones de los dos plásmidos. El panel superior izquierdo es células no tratadas; los paneles inferiores muestran células con un plásmido que codifica GFP no mutante en lugar de pGFPstop57.

Figura 6: Microscopía de fluorescencia de pocillos que muestran fluorescencia verde en células HeLa 24 o 48 horas después de ningún tratamiento, o transfección con oligonucleótido 50 nM o 200 nM #11 (o con 500 nM de un oligonucleótido de control) junto con pGFPstop57.

Figura 7: Espectros FACS de células HeLa no tratadas (pico izquierdo) o transfectadas (pico derecho). En 7A-7F, las células se transfectaron con pGFPstop57 y oligonucleótido #11. En 7B-7F (pero no 7A) las células también se transfectaron con pADAR2. En 7G y 7H se expresó GFP no mutante.

Todas las realizaciones ilustradas en los dibujos se pueden combinar, como se explica en la descripción detallada de la invención en este documento.

Modos para realizar la invención

Ejemplo 1: Inversión de una mutación no en sentido en un ARN diana de GFP mediante edición A a I dirigida al sitio

Constructo de oligonucleótidos por utilizar: 5'-cgcgcggttttcgcgcg**GCUGAAC*CACUGCAC**-3' (SEQ ID NO: 1). Las células HeLa (ATCC, CCL-2) se cultivan en medio Eagle modificado de Dulbecco (Life Technologies) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %. Las células se mantienen en una atmósfera de aire humidificado con 5 % de CO₂. Las células se siembran en una placa de 24 pocillos un día antes de la transfección y cuando alcanzan el 70-80 % de confluencia. Se utilizó el constructo informador de GFP con una actividad de GFP abolida debido a un codón de detención TGA. Se mezclan 100-200 ng de ADN plasmídico y 500 ng de constructo de oligonucleótidos (10-100 pmol) en la cantidad apropiada de medio Opti-MEM I (Life Technologies) y reactivo Lipofectamina 2000 y las células se transfectan de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Las células se incuban a 37 °C en una incubadora de CO₂ y el medio se reemplaza después de 4-6 horas. Después de 48 horas, las células se analizan bajo el microscopio de fluorescencia para evaluar la eficacia del oligo para restaurar la expresión de GFP.

Experimentos adicionales usaron nuevamente una GFP mutante que tenía un codón de detención TAG interno debido a una mutación de punto G→A, expresada a partir de un plásmido ('pGFPstop57'). Las células se transfectaron adicionalmente con un plásmido que codifica ADAR2 para garantizar que las células pudieran realizar la edición de ARN. Se prepararon varios oligonucleótidos para restaurar la expresión de GFP mediante la desaminación del residuo mutante A, en base al principio de una porción de direccionamiento específica para la mutación de GFP y una porción de reclutamiento basada en GluR-B.

Se probaron siete oligonucleótidos de ARN, y estos se dirigieron a formas cortas, medias o largas de GluR-B (S/M/L; diferentes longitudes de la porción de reclutamiento). Además, estos tenían las porciones de selección y reclutamiento en cualquier orden (corriente arriba/corriente abajo), y en algunos casos los oligos incluían regiones químicamente modificadas (la porción de reclutamiento se modificó químicamente para incluir azúcares 2'-OME y enlaces de

fosforotioato; la porción de direccionamiento fue modificada de la misma manera, excepto por la posición mutante A (doblemente subrayado) y sus dos nucleótidos flanqueantes). Todos los oligos incluyen SEQ ID NO: 7 (subrayado), y las porciones de orientación de GFP están en negrita:

Oligo	GluR-B (longitud y posición)		Modificación	Secuencias (SEQ ID NO:)
#2	S	3'	sin modificar	GUGUUGGCC<u>CAUGGAACA</u>UAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA (16)
#3	S	5'	2'OMe-PS	UAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA<u>GUGUUGGCC<u>CAUGGAACA</u></u> (17)
#4	S	3'	2'OMe-PS	GUGUUGGCC<u>CAUGGAACA</u>UAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA (18)
#6	M	3'	sin modificar	GUGUUGGCC<u>CAUGGAACA</u>UAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAAGUAU (19)
#9	L	5'	sin modificar	GGAAUA<u>GUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA</u>UAUAUCCCGUGUUGGCC<u>CAUGGAACA</u> (20)
#10	L	3'	sin modificar	GUGUUGGCC<u>CAUGGAACA</u>GGAAUA<u>GUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA</u>UAUAUCC (21)
#11	L	5'	2'OMe-PS	GGAAUA<u>GUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA</u>UAUAUCCCGUGUUGGCC<u>CAUGGAACA</u> (22)

Las células HeLa se cultivan en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %. Las células se mantienen en una atmósfera de aire humidificado con 5 % de CO₂. Se siembran 8x10⁴ células en un pocillo de una placa de 24 pocillos un día antes de la transfección y cuando alcanzan 70-80 % de confluencia se transfectan transitoriamente con (i) plásmido oligonucleótido + GFPstop57 o (ii) plásmidos oligonucleótido + GFPstop57 + ADAR2 usando Lipocetamina 2000 de acuerdo con el procedimiento del fabricante. El medio se actualiza 24 horas después de la transfección, y la expresión de GFP se verifica bajo el microscopio de fluorescencia 24 horas después.

También se realiza análisis FACS. Las células se tripsinizan y se recogen en un tubo Eppendorf y luego se resuspenden en tampón de tinción para citometría de flujo. Las células intactas se seleccionan en función de las propiedades morfológicas utilizando la dispersión frontal y la dispersión lateral, excluyendo los residuos. De las células intactas, se calculan los valores medios y medios de la intensidad fluorescente media (MFI) de GFP. Los histogramas superpuestos se crean utilizando el editor de diseño.

Los resultados para las células transfectadas sin el plásmido ADAR se muestran en la Figura 4, y la fluorescencia verde por encima de los niveles observados en los controles (que se debe a la autofluorescencia de las células y/o componentes del medio) es claramente visible para los siete oligos. Los oligos #10 y #11 dieron los mejores resultados (ambos con una porción de reclutamiento de GluR-B larga), y el oligo con una porción de reclutamiento corriente arriba (#11) fue ligeramente mejor.

Por lo tanto, se eligió oligo #11 para estudios adicionales en combinación con el plásmido que codifica ADAR2. La Figura 5 muestra nuevamente que las células tratadas con oligo #11 fluorescen por encima de los niveles observados en los controles negativos. A modo de comparación, las células se transfectaron con un plásmido que codifica una GFP no mutante y se observó la fluorescencia esperada (Figura 5, panel inferior).

Se probaron diferentes concentraciones de oligo #11, que varían de 50-1500 nM. La Figura 6 muestra resultados de ejemplo después de 24 o 48 horas usando 50 y 200 nM, junto con células no tratadas (izquierda) y células de control que se probaron con 500 nM de un oligo de control que tiene la misma longitud y modificaciones químicas que el oligo #11. Oligo #11 mostró un aumento de fluorescencia dependiente del tiempo, que no se observó con el oligo control.

El efecto del oligonucleótido sobre la expresión de GFP también fue visible por FACS (Figura 7). Las células tratadas con oligo #11, con (7B-7F) o sin (7A) el plásmido ADAR2, mostraron un aumento en la fluorescencia de GFP en relación con las células no tratadas (pico izquierdo). Se usó GFP no mutante como control positivo (7G-7H).

Ejemplo 2: Introducción de un sitio de empalme críptico en un ARN diana CEP290 mediante edición A a I dirigida al sitio

Construido de oligonucleótidos por utilizar: 5'-cgcgcggttttcgcgcg**GAGAUAC*****UCACAAUU**-3'(SEQ ID NO: 2).

Todas las líneas celulares son fibroblastos humanos, generados a partir de biopsias de piel. FBL1 (CL10-00008) y FBL2 (CL12-00027) son de tipo salvaje y representan líneas celulares de control, FBL3 (CL12-00035) y FBL4 (CL12-00036) son mutantes homocigotos para una mutación en CEP290 (c.2991+1655A>G). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Life Technologies) suplementado con 20 % de FBS, Pen/Strep al 1 % y piruvato de sodio al 1 %.

Un día antes de la transfección, las células se siembran en una densidad de 2x10⁵/pocillo en una placa de 6 pocillos en un volumen total de 2,5 ml de medio. El día de la transfección, se agrega AON por analizar a cada pocillo en una concentración final de 100 nM usando maxPEI (Polysciences) como agente de transfección, con una relación de masa oligo:PEI de 1:4. Después de 24 h, las células se lavan con PBS y el lisado celular se recoge y se congela a -80 °C.

El ARN se aísla de los lisados celulares que se han mantenido a -80°C utilizando el kit Promega Kit ReliaPrep ARN Cell Miniprep System. El ARN total se cuantifica usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000.

Se usan 400 ng de ARN como plantilla para la síntesis de ADNc usando el kit de síntesis de ADNc Verso (Thermoscientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ADNc se diluye 2,5 veces para esta reacción y se usan 2 µl de este ADNc diluido como plantilla. La amplificación de la secuencia diana utiliza AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase de Life Technologies. Los cebadores utilizados son ex26_Fw (SEQ ID NO: 10) y ex27_Rv (SEQ ID NO: 11) con las condiciones de PCR de la siguiente manera: mantener 5 minutos a 95 °C, desnaturalizar 30 segundos a 95 °C, fusionar 30 segundos a 58 °C y extender 35 segundos a 72 °C, 35 ciclos, la extensión final es de 7 minutos a 72 °C.

Los fragmentos de PCR se analizan en el bioanalizador Agilent 2100 usando el kit Agilent DNA 1000 de Agilent Technologies. Este kit contiene un chip compuesto de microcanales interconectados, a través del cual los fragmentos se separan en función de su tamaño a medida que pasan a través del mismo electroforéticamente. Para medir el nivel de expresión del ARNm de CEP290, los transcritos de tipo salvaje y mutante se amplifican como fragmentos de 93 pb y 117 pb, respectivamente. El ARNm de la proteína ribosómica grande P0 humana (RPLP0) se utiliza como normalización. Los cebadores utilizados son wt_Fw (SEQ ID NO: 12), wt_Rv (SEQ ID NO: 13), mt_Fw (SEQ ID NO:

14) y mt_Rv (SEQ ID NO: 15). Para esta reacción, SYBR selecciona la mezcla maestra de Life Technologies junto con ADNc diluido 10x usado como plantilla. El programa de PCR es de 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 2 minutos, 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 62,5 °C durante 1 minuto.

Ejemplo 3: Inversión de una sustitución de aminoácidos en un ARN diana CFTR G551D mutante mediante edición A a I dirigida al sitio

Construido de oligonucleótidos por utilizar: 5'-cgcgcggtttcgcgcg**CGUUGAC***C**UCCACUC**-3' (SEQ ID NO: 3).

Las líneas celulares son fibroblastos humanos, generados a partir de biopsias de pericardio de piel y corazón, GM00142 y GM03465, respectivamente, Coriell Institute Cell Repository). Ambos son heterocigotos: un alelo lleva la mutación de eliminación deltaF508 (Phe508Del) y un segundo alelo lleva una transición de G a A en el nucleótido 1784 (1784G>A) que convierte el codón gly-551 (GGT) en un asp (GAT), lo que resulta en una mutación no en sentido en el exón 11 en el gen CFTR [Gly551Asp (G551D)]. Todas las líneas celulares se cultivan en medio esencial mínimo de Eagle (Life Technologies) con sales de Earle y aminoácidos no esenciales suplementados con FBS al 15 % no activado y Pen/Strep al 1 %.

Un día antes de la transfección, las células se siembran a una densidad de 2×10^5 /pocillo en una placa de 6 pocillos en un volumen total de 2,5 ml de medio. El día de la transfección, el oligo por analizar se agrega a cada pocillo en una concentración final de 100 nM usando maxPEI (Polysciences) como agente de transfección, con una relación de masa oligo:PEI de 1:4. Después de 24 h, las células se lavan con PBS y el lisado celular se recolecta y se congela a -80 °C.

El ARN se aísla de los lisados celulares que se han mantenido a -80°C usando el kit Promega Kit ReliaPrep RNA Cell Miniprep System. El ARN total se cuantifica usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000. Se usan 400 ng de ARN como plantilla para la síntesis de ADNc usando el kit de síntesis de ADNc Verso (Thermoscientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Primero se sometió a 1 µl de ADNc a PCR con 0,4 µM de cebadores de avance y reverso, se ensamblaron 25 µM de cada dNTP, 1× tampón AmpliTaq Gold® 360, 3,125 MgCl₂ 30 mM y 1,0 unidades de polimerasa AmpliTaq Gold® 360 (todas de Life Technologies). Los cebadores utilizados son los SEQ ID NO: 26 (fwd) y 27 (rev). Los ciclos de PCR se realizaron utilizando las siguientes condiciones de ciclización. Una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 7 min fue seguida por 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C y 45 s a 72 °C. Las amplificaciones por PCR se terminaron por un período de extensión de 7 min a 72 °C. Se usó 1 µl de la PCR anterior en un programa de PCR anidada que contenía 35 cebadores directos de 0,4 µM y un cebador de índice MiSeq único por muestra, 25 µM de cada dNTP, 1× regulador AmpliTaq Gold® 360, 3,125 mM MgCl₂ y 1,0 unidades de polimerasa AmpliTaq Gold® 360. Los ciclos de PCR se realizaron utilizando las siguientes condiciones de ciclización: un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 7 minutos fue seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 45 segundos a 72 °C. Las reacciones se terminaron usando un período de extensión de 7 minutos a 72 °C. Antes de cargar los productos de PCR que contienen las secuencias del cebador de la secuencia MiSeq en el secuenciador, se midió la concentración de los productos de PCR purificados utilizando un fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se hicieron dos tubos de ensayo para los estándares haciendo diluciones de 20 veces de los 2 estándares estándar en solución de trabajo. Para cada muestra, se prepararon 200 µl de solución de trabajo en 10 tubos separados, se introdujo 1 µl del producto de PCR en esta solución y se mezcló mediante agitación vortical durante un par de segundos. Las muestras se midieron frente a los dos estándares y en consecuencia se calculó la concentración en ng/µl. La secuenciación de los productos de PCR se realizó en el sistema MiSeq™ de Illumina, que utiliza secuenciación por síntesis para proporcionar datos de secuencia rápidos de alta calidad.

Ejemplo 4: Inversión de una mutación de sustitución de aminoácidos en la transcripción de α-1-antitripsina (A1AT) mediante edición dirigida de A a I para el tratamiento de la deficiencia de A1AT

Oligonucleótidos (SEQ ID NO: 28):

ADAR45: rGrGrArArUrArGrUrArUrArArCrArArUrArUrgcrurarArUrGrUrUrGrUrUrArUrArGr
UrArUrCrCrCmC*mA*mG*mU*mCmCmCmUmUmUmCrUrCrGmUmCmGmAmUmGmG*m U*mC*mA*mG

ADAR47: mG*mG*mA*mA*mU*mA*mG*mU*mA*mU*mA*mA*mC*mA*mA*mU*mA*mU*m
G*mC*mU*mA*mA*mA*mU*mG*mU*mU*mG*mU*mU*mA*mU*mA*mG*mU*mA*mU*mC*
mC*mCmC*mA*mG*mU*mCmCmCmUmUmUmCrUrCrGmUmCmGmAmUmGmG*mU*mC* mA*mG

r = sin modificaciones

m = 2'O-Me

* = enlace de fosforotioato

Transfección de fibroblastos de hígado.

Se proporcionan fibroblastos de hígado de Coriell Cell Repository (GM11423), aislado de un sujeto donante homocigoto para el alelo Z (ZZ), que resulta de una transición G>A en el nucleótido 9989 en el exón 5 del gen

SERPINA1 [9989G>A] que da como resultado una sustitución de lisina por ácido glutámico en el codón 342 [Glu342Lys (E342K)]. Las células se mantienen en medio EMEM (Life Technologies) y se complementan con FBS al 15 %. Un día antes de las transfecciones, las células se siembran en una placa de 6 pocillos en un volumen total de 2 ml de medio. El día de la transfección, el oligonucleótido se agrega a 1xPBS (Thermo Fisher Scientific) en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y se mezcla con MaxPei (Polysciences) y se incuba todo junto durante 20 minutos. Mientras tanto, el medio de cultivo celular se elimina de las células y se agrega una cantidad adecuada de EMEM fresco con FBS al 15 %. Luego, la mezcla diluida de ADN/Oligo-MaxPei se agrega a la célula por pipeteo suave gota a gota. Las células se incuban a 37 °C y el medio se actualiza después de 6-24 h.

Aislamiento de ARN

- El aislamiento de ARN se realiza usando el sistema de minipreparación de células de ARN Reliaprep (Promega) de acuerdo con el procedimiento del fabricante. En resumen, se retira el medio de cultivo y las células se lavan con PBS frío. Se añaden 250 µl de tampón de lisis en cada pocillo de la placa de 6 pocillos. La placa se balancea suavemente y las células se someten a lisis completamente por pipeteo repetido sobre la superficie del pozo. Se añaden 85 µl de isopropanol al lisado como se recomienda y el lisado se transfiere a la minicolumna y se centrifuga durante 30 segundos a 12.000-14.000 g (RT), el líquido se desecha. Se añaden 500 µl de solución de lavado de ARN y se centrifugan nuevamente 30 segundos a 12.000-14.000 g. En un tubo estéril, la mezcla maestra de incubación de ADNasa I se prepara combinando la muestra de 24 µl de Tampón Yellow Core, 3 µl de MnCl₂ 0,09M, 3 µl de ADNasa I y 30 µl de mezcla de ADNasa I recién preparada se agrega a la membrana en la columna de cada muestra, se incuba durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se agregan 200 µl de solución de lavado de columna y se centrifuga durante 15 segundos a 12.000-14.000 g. Después de eso, se agregan 500 µl de solución de lavado de ARN y se centrifuga durante 30 segundos a 12.000-14.000 g y se desecha el líquido. La minicolumna se coloca en un nuevo tubo de recolección y se añaden 300 µl de solución de lavado de ARN y se centrifuga a 14.000 g durante 2 minutos. Cada minicolumna se coloca en un tubo de elución y se agrega agua sin nucleasa a la membrana y se centrifuga durante 1 minuto. Por último, la concentración de ARN se mide en el Nanodrop.

Síntesis de ADNc

- La síntesis de ADNc se realiza usando el kit de síntesis de ADNc Verso (Thermo Fisher) con entrada de ARN de 500 ng o 1000 ng. La mezcla de ARN se prepara tomando la cantidad deseada de ARN y completándola hasta un volumen total de 11 µl agregando agua. La mezcla se calienta durante 5 min a 70 °C, luego se enfría. La mezcla de ADNc se prepara de acuerdo con el esquema de pipeteo proporcionado por el proveedor. Se ponen 9 µl de mezcla de ADNc en un tubo de reacción y se añaden 11 µl de mezcla de ARN y se mantiene en el termociclizador durante 30 minutos a 42 °C y 2 min a 95 °C.

- La PCR se realiza utilizando el kit AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase 1000U (Applied Biosystems). Se prepara una mezcla maestra de PCR agregando 1 µl de ADNc, 2,5 µl de tampón 10x, 3 µl de MgCl₂, 0,5 µl de dNTP, 1 µl de cada cebador, 0,5 µl de polimerasa Taq y agregando agua para completar 25 µl. El programa de PCR es el siguiente; 95 °C por 5 min, 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min por 35 ciclos y 72 °C por 7 min. Después de la PCR, las muestras se procesan en el Bioanalyzer utilizando el kit DNA 1000 (Agilent) y el programa.

Purificación de muestras para PCR

- Las muestras se purifican usando un kit de limpieza de PCR Nucleospin (Macherey-Nagel) para asegurar la eliminación de la contaminación de los productos de PCR. Se mezcla 1 volumen de muestra de PCR con 2 volúmenes de NT1 y las muestras se cargan en el gel NucleoSpin® y la columna de limpieza de PCR se coloca en un tubo de recolección y se centrifuga durante 30 s a 11000 x g. El líquido se desecha y la columna se vuelve a colocar en el tubo de recolección. Se añaden 700 µl de tampón NT3 al gel NucleoSpin® y se centrifuga durante 30 s a 11000 x g. La etapa de lavado se repite y los tubos se centrifugan durante 1 minuto a 11000 x g para eliminar el tampón NT3.

- Se colocan NucleoSpin® Gel y PCR Clean-up Column en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml, se añaden 15-30 µl de tampón NE y se incuban durante 1 minuto a temperatura ambiente y luego se centrifuga durante 1 min a 11000 x g. La concentración de ADN se mide utilizando el procedimiento Nanodrop.

Digestión en restricción

- Después de la limpieza por PCR, el amplicón SERPINA1 se somete a digestión de restricción Hyp99I. La enzima reconoce la última G en la secuencia CGACG en WT y corta el amplicón en dos partes, pero no puede cortar la secuencia CGACA en la versión mutante debido a la ausencia de la segunda G. Por lo tanto, si la edición es exitosa, habrá algo de ADN WT como sustrato para la digestión de restricción Hyp99I. Se usa 1 unidad de Hyp99I (NEB) para digerir 0,1 µg de ADN. Se utiliza una entrada de ADN de 0,5 µg. Las muestras se diluyen en agua libre de nucleasas y se incuban durante 1-1,5 horas a 37 °C, la enzima se inactiva por incubación posterior de las muestras a 65 °C durante 20 minutos. Después de la incubación, las muestras se cargan en el Bioanalyzer utilizando el kit DNA1000 (Agilent) y se programa para visualizar los resultados.

Taqman PCR

El ensayo de genotipificación SNP se realiza usando el ensayo de genotipificación SNP SERPINA1 personalizado (ThermoFisher Scientific). Este ensayo se realiza en paralelo al ensayo de digestión con enzimas de restricción para explorar cuál ensayo es más sensible para la detección de la edición. Las sondas específicas para WT y SERPINA1 mutante tienen diferentes grupos fluorescentes unidos, VIC y FAM, respectivamente. Por lo tanto, es posible cuantificar el aumento o la disminución de las cantidades de transcripciones WT/mutantes. La mezcla de reacción se prepara añadiendo 5 µl de mezcla maestra y 0,5 µl de mezcla sonda-cebador. Las secuencias de oligos utilizados son: sonda WT (SEQ ID NO: 29), sonda mutante (SEQ ID NO: 30), cebador directo (SEQ ID NO: 31) y cebador inverso (SEQ ID NO: 32). Se añaden 5,5 µl de mezcla de reacción a los pocillos designados de una placa de 96 pocillos. Se añaden 4,5 µl de ADNc a cada pocillo. El programa de PCR se ejecuta de la siguiente manera: 95 °C durante 10 minutos, 92 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 90 segundos durante 50 ciclos. Los resultados se analizaron utilizando el CFX Manager.

Ejemplo 5: Inversión de una mutación de sustitución de aminoácidos G2019S en la transcripción LRRK2 por edición dirigida de A a I para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

Las mutaciones en los dominios catalíticos de Roc-COR y quinasas del gen de quinasa 2 repetido rico en leucina (ID del gen LRRK2: 120892) son una causa común de la enfermedad de Parkinson familiar (EP). Los inventores se propusieron direccionar hacia la mutación G2019S en el transcrito pre-ARNm LRRK2 (Transcript RefSeq NM_198578.3) usando AON capaces de reclutar ADAR1 y 2 en virtud de la porción de GluRB de longitud completa o acortada como porción de reclutamiento vinculada a una porción de focalización con complementariedad a la secuencia que rodea la mutación G a A en el exón 41 en la posición G6055 (véase la secuencia a continuación con la G mutada subrayada). Esta mutación también se identifica como la variación de Genbank dbSNP rs34637584, comúnmente conocida como G2019S.

Secuencia de LRRK2 Exón 41 con el resto wt G resaltado en la posición 6055:

ATACCTCCACTCAGCCATGATTATATACCGAGACCTGAAACCCCACAATGTGCTGCTT
TTCACACTGTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTC
AGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAACATCAGAGGGGCACACCAG (SEQ ID NO: 33)

Alelo mutante y traducción:

GCT GAC TAC AGC ATT GCT CAG SEQ ID NO: 34

Ala Asp Tyr Ser Ile Ala Gln SEQ ID NO: 35

Alelo normal y traducción (después de la edición A a I):

GCT GAC TAC GGC ATT GCT CAG SEQ ID NO: 36

Ala Asp Tyr Gly Ile Ala Gln SEQ ID NO: 37

Las siguientes secuencias se han diseñado para direccionar a la mutación LRRK2 G2019S. Los nucleótidos en negrita forman la porción de focalización; todos los nucleótidos son 2'-OMe excepto aquellos subrayados; * designa un enlace PS. Los AON varían en la longitud de la porción de direccionamiento 25 (LRRK2-ADAR1 y LRRK2-ADAR3) o 30 nucleótidos (LRRK-ADAR2 y 4). Los AON varían en la longitud de la porción de reclutamiento: porción de reclutamiento de GluRB acortada (LRRK2-ADAR3 y 4) y porción de reclutamiento de GluRB de longitud completa (LRRK2-ADAR1 y 2).

LRRK2-	Secuencia (SEQ ID NO:)
ADAR1	GUGGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCACACUGA GCAU <u>GCc</u> GUAGUCAG *C*A*A*U (SEQ ID NO: 38)
ADAR2	GUGGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCACCGUACU GAGCAU <u>GCc</u> GUAGUCAGCA *U*C*U*U (SEQ ID NO: 39)
ADAR3	GGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCACUGAGCAA UGCc GUAGUCAG *C*A*A*U (SEQ ID NO: 40)
ADAR4	GGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCCGUACUGAGC AAUGC <u>c</u> GUAGUCAGCA *U*C*U*U (SEQ ID NO: 41)

La corrección de LRRK2 se evalúa en fibroblastos mutantes LRRK2G6055A por medio de secuenciación de ARN, análisis de Inmunoprecipitación Western del estado de (auto)fosforilación LRRK2 y lecturas funcionales de fenotipos mitocondriales asociados a LRRK2 establecidos (tasa de consumo de oxígeno y potencial de membrana mitocondrial). Véase: Tatiana et al. (2012) Hum. Mol. Genet. 21(19): 4201-4213; Smith et al. (2015) Molecular Neurobiology, 1-17; y Grünewald et al. (2014) Antioxidants & Redox Signaling, 20(13), 1955-1960. La línea de fibroblastos homocigotos LRRK2G6055A fff-028 (Telethon Network of Genetic Biobanks), las líneas heterocigotas G6055A ND29492, ND29542, ND29802, y las líneas de control sanas GM023074, GM08402 (Coriell Institute), se transfectan con LRRK2-ADAR-ADAR AON usando Lipofectamina 2000. Después de 48-96 horas de incubación, se realizan los siguientes análisis:

1) Para detectar el transcrito de LRRK2 editado de A a I, las células se someten a lisis, se aísla el ARN mediante procedimientos estándar y se someten a un análisis de secuenciación de ARN semicuantitativo utilizando los siguientes cebadores de secuencia de las SEQ ID NO: 42 y 43. Las secuencias de ARNm editadas de A a I aparecen después de la transfección de LRRK2-ADAR-AON.

2) Se ha demostrado previamente que la proteína LRRK2G6055A (Smith et al., 2015) muestra un aumento de la autofosforilación en la serina 955 después del tratamiento de estrés con el agente despolarizante de la membrana mitocondrial valinomicina (10 μ M durante 24 h), debido al aumento de la actividad catalítica del dominio quinasa, en comparación con LRRK2wt. El tratamiento con LRRK2-ADAR-AON reduce la fosforilación de serina-955 de las células LRRK2G6055A tratadas con valinomicina a menos parcialmente, potencialmente incluso completamente a niveles de tipo salvaje. Esto puede evaluarse mediante análisis de inmunotransferencia Western (Smith et al.) Utilizando anticuerpos LRRK2 fosfo-S955 (clon Abcam MJF-R11-(75-1)) y anticuerpos LRRK2 totales (clon Abcam MJFF2 (c41-2)).

3) Los fibroblastos LRRK2G6055A muestran alteraciones en la respiración mitocondrial (OXPHOS), incluido el aumento de la fuga de protones (Smith et al., 2015; Grünewald et al., 2014) que puede revertirse después de la transfección LRRK2-ADAR-AON. La tasa de consumo de oxígeno en condiciones respiratorias basales y forzadas se evalúa utilizando un analizador de flujo extracelular Seahorse XF24 (Seahorse Bioscience), un dispositivo que mide la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo en intervalos de tiempo de 2 s mediante sondas de sensor de estado sólido. Este análisis se puede realizar junto con el kit XF Xell Mito Stress Test (Seahorse Bioscience), que mediante tratamiento secuencial con oligomicina, carbonil cianuro-4-(trifluorometoxi)fenil hidrazona (FCCP), rotenona y antimicina-A, puede determinar parámetros metabólicos tales como respiración basal, producción de ATP, fuga de protones y respiración máxima. El ensayo se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la fuga de protones se define como el consumo de oxígeno restante después del tratamiento con oligomicina.

4) Los fibroblastos LRRK2G6055A muestran un potencial de membrana mitocondrial disminuido en comparación con las células de control (Smith et al., 2015; Grünewald et al., 2014). El potencial de membrana mitocondrial se evalúa con el colorante catiónico lipofílico tetrametilrodamina metiléster (TMRM), utilizado en modo sin enfriamiento (0,5-30 nM, determinado empíricamente), cargado en medio de cultivo sin rojo de fenol durante 20 minutos. Después de la carga de colorante, la fluorescencia TMRM mitocondrial en estado estacionario se mide mediante microscopía confocal de células vivas y análisis de imágenes. La transfección con LRRK2-ADAR-AON puede aumentar el potencial de membrana mitocondrial al menos parcialmente, potencialmente incluso completamente para controlar los niveles.

Conclusiones

Los ejemplos descritos anteriormente muestran cómo realizar los cambios deseados en una secuencia de ARN diana mediante la edición dirigida al sitio de nucleótidos en una molécula de ARN diana usando constructos de oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Los ejemplos enseñan cómo eliminar un codón de detención para volver a abrir el marco de lectura de un constructo de expresión de GFP, crear un sitio de empalme para cambiar el patrón de empalme del ARN diana que codifica CEP290, y cómo establecer una sustitución de aminoácidos deseada haciendo un cambio en un codón en la secuencia de ARN diana que codifica una proteína CFTR G551D mutante. La edición exitosa de ARN puede confirmarse convenientemente, por ejemplo, observando células fluorescentes en el caso de la inversión de la mutación no en sentido de GFP, observando un cambio en las bandas de RT-PCR en un gel de tipo salvaje a mutante en el caso de introducción el sitio de empalme críptico en el ARN de codificación CEP290, y mediante secuenciación, o mediante el uso de un ensayo funcional (por ejemplo, un ensayo de cámara de Ussing), en el caso de la reversión de la mutación G551D en el ARN de codificación CFTR, y similares. También se puede realizar un trabajo similar en la α -1-antitripsina (A1AT) y LRRK2.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 Constructo de oligonucleótidos de ADN-ARN que edita una mutación no en sentido en eGFP:
cgcgcggttttcgcgcgGUGAACACUGCAC

SEQ ID NO: 2 Constructo de oligonucleótidos de ADN-ARN que crea un sitio de empalme críptico en hCEP290:
cgcgcggttttcgcgcgGAGAUACUCACAAUU

SEQ ID NO: 3 Constructo de oligonucleótidos de ADN-ARN que edita una mutación G551D en hCFTR:
cgcgcgcttttcgcgcgCGUUGACCUCCACUC

SEQ ID NO: 4 hCFTR ADN que muestra la mutación G551D hCFTR en minúsculas (n es T o C):

ATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACCAATTTTGAGGAAAGGATACAG
ACAGCGCCTGGAATTGTCTAGACATATACCAAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATGGAAAGAGAATGGG
ATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAACTCATTAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTCTGGAGATTATGTTCTATGGAATC
TTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCCTATGACCCGGATAACAAGGA
GGAACGCTCTATCGCGATTATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCTCCTACACCAGCCATTTTGTG
GCCTTCATCACATTGGAATGCAGATGAGAAATAGCTATGTTTATGTTGATTTATAAGAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTA
GATAAAATAAGTATTGGACAACCTGTTAGTCTCCTTTCCAAACAACCTGAACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTCTG
TGAGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTTCC
TGATAGTCTTGGCCTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGGAAGATCAGTGAAAGA
CTTGATGATTACCTCAGAAATGATTGAAAATATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAATGGAAAAATGATTGAAAA
CTTAAGACAAACGAACCTGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACCTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTCTCAGGGTTCT
TTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTAAGCACTAATCAAAGGAATCATCTCCGAAAAATATTCACCACCATCTCATTCTGCATT
GTTCTGGCGATGGCGGTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAAATGTTATGACTCTCTTGAGAGCAATAAAACAAAATACAGGA
TTTCTTACAAAAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGG
AGGAGGGATTGGGGAATTTTGGAAAGCAAAACAAATAACAAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTCTCTC
AGTAATTTCTCAGTTCTTGGTACTCCTGTCTGAAAGATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCGGTGCTGGATC
CACTGATCGCAAGCAAGACTTCACTTCAATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAAATTAACAAAGTGAAG
TTTCATTCTGTTCTCAGTTTCTCGGATTTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAAATATCATCTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGA
TACAGAAGCGTCACTAAAGCATGCCAATAGAAAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGG
AATCACACTGAGTGGAGanCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATAGACTCTC
CTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAGCTGATGGCTAACAAAAGTGGATTTTG
GTCACCTTCTAAAAATGGAACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATTTTATGGGACATTTTC
AGAAGTCCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAACTCATGGGATGTGATTCTTTGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGAAAT
CAATCCTAAGTACAGCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGAAACAAAAAACAACTCTTTTAA
CAGACTGGAGAGTTTGGGAAAAAGGAAGAATTTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAAAATTTCCATTGTGCAAAAGAC
TCCTTACAAAATGAATGGCATCGAAGAGGATTCTGATGAGCCTTTAGAGAGAAGGCTGCTCCTTAGTACCAGATTCTGAGCAGGGAG
AGGCGATACTGCCCTCGCATCAGCGTGATCAGCACTGGCCCCACGCTTCAGGCACGAAGGAGGAGTCTGTCTGAACTGATGACA
CACTCAGTTAACCAGGTGAGAATTTACCGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAGGTGTCTGCTGGCCCTCAGGCACAACTTGC
TGAAGTGGATATATATTCAAGAAGGTTATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGT
GCTTTTGTGATGATGAGGAGCATACAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTTCGATATATTACCTGCAAGAGCTTAAAT
TTTGTGCTAATTTGGTGTCTAGTAATTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTCTTTGGTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCTCT
TCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTACA
TTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGTCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCAGTGGTGCATCTAATCAGTGTCGAAA
ATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTCTTCAAGCACCATGTCAACCCCTCAACAGCTTGAAGCAGGTGGGATTCTTAATAG
ATTCTCCAAAGATATAGCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAG
CTATAGCAGTTGTGCGAGTTTACAACCTTACATCTTTGTTGCAACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATAT
TTCTCCAAACCTCAGCAACTCAAACTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTACAGCTTAAAGG
ACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGT
TCTTGTAAGTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGATTTTGTCTCTTCTTCAATTGCTTACCTTCAATTTCC
ATTTTAAACACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTGGGCTGT
AACTCCAGCATAGATGTGATAGCTTGTGCGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTTATTGACATGCCAACAGAGGTAAACCTA
CCAAGTCAACCAACCATACAAGATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAAATCACACGTGAAGAAAGATGACATCTGG
CCCTCAGGGGGCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAAATACACAGAAGGTGGAATGCCATATTAGAGAACATTTCTCTC
AATAAGTCTTGGCCAGAGGTGGGCTCTTGGGAAGAACTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGGAGACTACTGA
ACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATACCA
CAGAAAGTATTTATTTTCTGGAACATTTAGAAAAAACTTGGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGC
AGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCTGGGAAGCTTGACTTTGTCTTGTGGATGGGGCTGTGTCTTAAGCC
ATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGTCTGTTGATGAACCCAGTGCTCATTG
GATCCAGTAACATACCAATAATTAGAAGAACTCTAAAACAGCATTTGCTGATTGCACAGTAATTTCTCTGTGAACACAGGATAGA
AGCAATGCTGGAATGCCAACAATTTTGGTCAAGAGAAGCAAGTGCAGGAGTACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGA
GGAGCCTCTTCCGGCAAGCCATCAGCCCTCCGACAGGTTGAAGCTCTTCCCCACCGGAACCTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCC
CAGATTGCTGCTTGAAGAGGAGACAGAAAGAAGGTTGCAAGATACAAGGCTT

5 **SEQ ID NO: 5 - Ejemplo de porción de reclutamiento**

CGCGCGTTTTTCGCGCG

SEQ ID NO: 6 - Ejemplo de porción de reclutamiento

AUANUAUACAAUUAUgcuuaAUGUUGUUUAUANUAU

SEQ ID NO: 7 - Ejemplo de porción de reclutamiento

10 UAUAACAAUUAUgcuuaAUGUUGUUUAUA

SEQ ID NO: 8 - Porción de direccionamiento genérica

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

SEQ ID NO: 9

GCAACUAGAGGUGAG

SEQ ID NO: 10

TGCTAAGTACAGGGACATCTTGC

5 **SEQ ID NO: 11**

AGACTCCACTTGTTCTTTTAAGGAG

SEQ ID NO: 12

TGACTGCTAAGTACAGGGACATCTTG

SEQ ID NO: 13

10 AGGAGATGTTTTCACTCCAGGT

SEQ ID NO: 14

CTGGCCCCAGTTGTAATTTGTGA

SEQ ID NO: 15

CTGTTCCCAGGCTTGTCAATAGT

15 **SEQ ID NO: 16**

GUGUUGGCCAUGGAACAUUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA

SEQ ID NO: 17

UAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUGUUGGCCAUGGAACA

SEQ ID NO: 18

20 GUGUUGGCCAUGGAACAUUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA

SEQ ID NO: 19

GUGUUGGCCAUGGAACAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAU

SEQ ID NO: 20

GGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCCGUGUUGGCCAUGGAACA

25 **SEQ ID NO: 21**

GUGUUGGCCAUGGAACAGGAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCCG

SEQ ID NO: 22

GGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCCGUGUUGGCCAUGGAACA

SEQ ID NO: 23

30 GGAAUANUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUANUAUCCCG

SEQ ID NO: 24

GUGGAAUANUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUANUAUCCCG

SEQ ID NO: 25

GUGGNAUANUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUANUAUNCCCG

35 **SEQ ID NO: 26**

GCCTGGCACCATTAAAGAAA

SEQ ID NO: 27

GCATCTTTGTATACTGCTCTTGCT

SEQ ID NO: 28

GGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCCCAGUCCCUUUCUCGUUGAUGGUCAG

SEQ ID NO: 29

5 CCATCGACGAGAAAAG

SEQ ID NO: 30

CATCGACAAGAAAAG

SEQ ID NO: 31

TCCAGGCCGTGCATAAGG

10 **SEQ ID NO: 32**

GCCCCAGCAGCTTCAG

SEQ ID NO: 33

ATACCTCCACTCAGCCATGATTATATACCGAGACCTGAAACCCACAAATGTGCTGCTTTTCACACTGTATCCCAATGCTGCCATCA
TTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAACATCAGAGGGCACACCAG

SEQ ID NO: 34

15 GCTGACTACAGCATTGCTCAG

SEQ ID NO: 35

ADYSIAQ

SEQ ID NO: 36

GCTGACTACGGCATTGCTCAG

20 **SEQ ID NO: 37**

ADYGIAQ

SEQ ID NO: 38

GUGGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCCACACUGAGCAAUGCcGUAGUCAGCAAU

SEQ ID NO: 39

25 GUGGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCCACGUACUGAGCAAUGCcGUAGUCAGCAAUCU
U

SEQ ID NO: 40

GGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCCACUGAGCAAUGCcGUAGUCAGCAAU

SEQ ID NO: 41

30 GGAAUAGUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUAGUAUCCCGUACUGAGCAAUGCcGUAGUCAGCAAUCUU

SEQ ID NO: 42

GTTTGAGATACCTCCACTCAGC

SEQ ID NO: 43

AGGTGCACGAAACCCTGGTG

35 **Listado de secuencias**

<110> PROQR THERAPEUTICS II B.V.

EDICIÓN DIRECCIONADA DE ARN

<130> P065300WO
 <140> PCT/EP2015/_
 <141> 2015-12-17
 5 <150> GB-1422511,4
 <151> 2014-12-17
 <150> GB-1512467.0
 <151> 2014-07-16
 <150> GB-1512595.8
 10 <151> 2015-07-17
 <150> GB-1521987.6
 <151> 2015-12-14
 <160> 43
 <170> SeqWin2010, version 1.0
 15 <210> 1
 <211> 31
 <212> ADN/ARN combinados
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Constructo de oligonucleótidos de ADN/ARN
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <223> /nota="ADN/ARN combinados"
 <400> 1
 25 cgcgcggttt cgcgcggcug aaccacugca c 31
 <210> 2
 <211> 31
 <212> ADN/ARN combinados
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Constructo de oligonucleótidos de ADN/ARN
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <223> /nota="ADN/ARN combinados"
 35 <400> 2
 cgcgcggttt cgcgcgga uacucacaau u 31
 <210> 3

<211> 31

<212> ADN/ARN combinados

<213> Constructo de oligonucleótidos de ADN/ARN

<220>

5 <221> características_misceláneas

<223> /nota="ADN/ARN combinados"

<400> 3

cgcgcggtttt cgcgcgcgguu gaccuccacu c 31

<210> 4

10 <211> 4440

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_misceláneas

15 <222> 1653

<223> 'n' es c o t

<400> 4

atgcagaggt	cgccctctgga	aaaggccagc	gttgtctcca	aacttttttt	cagctggacc	60
agaccaat	tgaggaaagg	atacagacag	cgccctggaat	tgtcagacat	ataccaaatc	120
ccttctgttg	attctgctga	caatctatct	gaaaaattgg	aaagagaatg	ggatagagag	180
ctggcttcaa	agaaaaatcc	taaactcatt	aatgcccttc	ggcgatgttt	tttctggaga	240
tttatgttct	atggaatctt	tttatattta	ggggaagtca	ccaaagcagt	acagcctctc	300
ttactgggaa	gaatcatagc	ttcctatgac	ccggataaca	aggaggaacg	ctctatcgcg	360
atztatctag	gcataggctt	atgccttctc	tttattgtga	ggacactgct	cctacaccca	420
gccatttttg	gccttcatca	cattggaatg	cagatgagaa	tagctatgtt	tagtttgatt	480
tataagaaga	ctttaaagct	gtcaagccgt	gttctagata	aaataagtat	tggacaactt	540
gttagtctcc	tttccaacaa	cctgaacaaa	tttgatgaag	gacttgcatt	ggcacatttc	600
gtgtggatcg	ctcctttgca	agtggcactc	ctcatggggc	taatctggga	gttggttacag	660
gcgtctgcct	tctgtggact	tggtttctctg	atagtccctg	ccctttttca	ggctgggcta	720
gggagaatga	tgatgaagta	cagagatcag	agagctggga	agatcagtga	aagacttgtg	780
attacctcag	aaatgattga	aaatatccaa	tctgttaagg	catactgctg	ggaagaagca	840
atggaaaaaa	tgattgaaaa	cttaagacaa	acagaactga	aactgactcg	gaaggcagcc	900
tatgtgagat	acttcaatag	ctcagccttc	ttcttctcag	ggttctttgt	ggtgttttta	960
tctgtgcttc	cctatgcact	aatcaaagga	atcatcctcc	ggaaaatatt	caccaccatc	1020
tcattctgca	ttgttctgcg	catggcggtc	actcggcaat	ttccctgggc	tgtacaaaaca	1080
tggatgact	ctcttgagagc	aataaacaaa	atacaggatt	tcttacaaaa	gcaagaatat	1140
aagacattgg	aatataactt	aacgactaca	gaagtagtga	tggagaatgt	aacagccttc	1200
tgggaggagg	gatttgggga	attatttgag	aaagcaaaac	aaaacaataa	caatagaaaa	1260
acttctaata	gtgatgcacg	cctcttcttc	agtaatttct	cacttcttgg	tactcctgtc	1320
ctgaaagata	ttaatttcaa	gatagaaaga	ggacagttgt	tggcggttgc	tggatccact	1380
ggagcaggca	agacttcact	tctaatagat	attatgggag	aactggagcc	ttcagagggg	1440
aaaattaagc	acagtggag	aatttcattc	tgttctcagt	tttcttggtg	tatgcctggc	1500
accattaaag	aaaatatcat	ctttgggtgt	tctatgatg	aatatagata	cagaagcgtc	1560
atcaaagcat	gccaaactaga	agaggacatc	tccaagtttg	cagagaaaga	caatatagtt	1620
cttgaggaga	gtggaatcac	actgagtggg	gancaacgag	caagaatttc	tttagcaaga	1680
gcagtataca	aagatgctga	tttgtattta	ttagactctc	cttttggtga	cctagatgtt	1740
ttaacagaaa	aagaaatatt	tgaagctgtg	gtctgtaaac	tgatggctaa	caaaactagg	1800
atatttggtc	cttctaaaat	ggaacattta	aagaaagctg	acaaaatatt	aattttgcat	1860
gaaggtagca	gctattttta	tgggacattt	tcagaactcc	aaaatctaca	gccagacttt	1920
agctcaaaac	tcatgggatg	tgattctttc	gaccaattta	gtgcagaaag	aagaaattca	1980
atcctaactg	agacottaca	ccgtttctca	ttagaaggag	atgctcctgt	ctcctggaca	2040
gaaacaaaaa	aacaatcttt	taaacagact	ggagagtttg	gggaaaaaag	gaagaattct	2100
attctcaatc	caatcaactc	tatacgaaaa	ttttccattg	tgcaaaagac	tcccttacaa	2160
atgaatggca	tcgaagagga	ttctgatgag	cctttagaga	gaaggctgtc	cttagtacca	2220
gattctgagc	agggagaggc	gatactgcct	cgcatcagcg	tgatcagcac	tggccccacg	2280
cttcaggcac	gaaggaggca	gtctgtcctg	aacctgatga	cacactcagt	taaccaagggt	2340
cagaacattc	accgaaagac	aacagcatcc	acacgaaaag	tgtcactggc	ccctcaggca	2400
aacttgactg	aactggatat	atattcaaga	aggttatctc	aagaaactgg	cttggaaata	2460
agtgaagaaa	ttaacgaaga	agacttaaag	gagtgccttt	ttgatgatat	ggagagcata	2520
ccagcagtga	ctacatggaa	cacatacctt	cgatatatta	ctgtccacaa	gagcttaatt	2580
tttgtgctaa	tttgggtgctt	agtaattttt	ctggcagagg	tggctgcttc	tttggttgtg	2640
ctgtggctcc	ttggaaacac	tcctcttcaa	gacaaaggga	atagtactca	tagtagaaat	2700
aacagctatg	cagtgattat	caccagcacc	agttcgtatt	atgtgtttta	catttacgtg	2760

ggagtagccg acactttgct tgctatggga ttcttcagag gtctaccact ggtgcatact 2820
 ctaatcacag tgtcgaaaat tttaaccac aaaatgttac attctgttct tcaagcacct 2880
 atgtcaaccc tcaacacggt gaaagcaggt gggattctta atagattctc caaagatata 2940
 gcaatttttg atgaccttct gcctcttacc atatttgact tcatccagtt gttattaatt 3000
 gtgattggag ctatagcagt tgtcgcagtt ttacaacctt acatctttgt tgcaacagtg 3060
 ccagtgatag tggcttttat tatgttgaga gcatatttcc tccaaaacct acagcaactc 3120
 aaacaactgg aatctgaagg caggagtcca attttcaact atcttgttac aagcttaaaa 3180
 ggactatgga cacttcgtgc cttcggacgg cagccttact ttgaaactct gttccacaaa 3240
 gctctgaatt tacatactgc caactgggtc ttgtacctgt caaactgog ctgggttccaa 3300
 atgagaatag aaatgatttt tgcacatctt ttcatctgtg ttaccttcat ttccatttta 3360
 acaacaggag aaggagaagg aagagttggt attatcctga ctttagccat gaatatcatg 3420
 agtacattgc agtgggctgt aaactccagc atagatgtgg atagcttgat gcgatctgtg 3480
 agccgagctt ttaagttcat tgacatgcca acagaaggta aacctaccaa gtcaacacaaa 3540
 ccatacaaga atggccaact ctcgaaagtt atgattattg agaattcaca cgtgaagaaa 3600
 gatgacatct ggccctcagg gggccaaatg actgtcaaag atctcacagc aaaatacaca 3660
 gaaggtggaa atgccatatt agagaacatt tcttctcaa taagtctgg ccagaggggtg 3720
 ggccctcttg gaagaactgg atcagggaag agtactttgt tatcagcttt tttgagacta 3780
 ctgaacactg aaggagaaat ccagatcgat ggtgtgtctt gggattcaat aactttgcaa 3840
 cagtggagga aagccttttg agtgatacca cagaaagtat ttattttttc tggaacattt 3900
 agaaaaaact tggatcccta tgaacagtgg agtgatcaag aaatatggaa agttgcagat 3960
 gaggttgggc tcagatctgt gatagaacag ttctctggga agcttgactt tgccttgtg 4020
 gatgggggct gtgtcctaag ccattggccac aagcagttga tgtgcttggc tagatctgtt 4080
 ctcatgaagg cgaagatctt gctgcttgat gaacccagtg ctcatttgga tccagtaaca 4140
 taccaaataa ttagaagaac tctaaaacaa gcatttgctg attgcacagt aattctctgt 4200
 gaacacagga tagaagcaat gctggaatgc caacaatttt tggatcataga agagaacaaa 4260
 gtgcggcagt acgattccat ccagaaactg ctgaacgaga ggagcctctt ccggcaagcc 4320
 atcagcccct ccgacagggt gaagctcttt cccacccgga actcaagcaa gtgcaagctt 4380
 aagccccaga ttgctgctct gaaagaggag acagaagaag aggtgcaaga tacaaggctt 4440

<210> 5

<211> 16

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Porción de reclutamiento

<400> 5

cgcgctttt cgcgcg 16

10 <210> 6

<211> 35

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Porción de reclutamiento

<220>

<221> características_miscláneas

<222> 4, 32

<223> 'n' es a, c, g o u, para formar un par de bases

20 <400> 6

auanuauaac aaauaucuaa auguuguuau anuau 35

<210> 7
 <211> 27
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Porción de reclutamiento
 <400> 7
 uauaacaaua ugcuaaaugu uguuaua 27
 <210> 8
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Porción de direccionamiento
 15 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21
 <223> 'n' es a, c, g o u
 <400> 8
 20 nnnnnnnnnn nnnnnnnncnn n 21
 <210> 9
 <211> 15
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Homo sapiens
 <400> 9
 gcaacuagag gugag 15
 <210> 10
 30 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 10
 tgctaagtac agggacatct tgc 23
 <210> 11

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Cebador
 <400> 11
 agactccact tgttcttta aggag 25
 <210> 12
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 12
 15 tgactgctaa gtacaggac atcttg 26
 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 aggagatgtt ttcactcc aggt 24
 <210> 14
 25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 14
 ctggccccag ttgtaatttg tga 23
 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador

<400> 15
ctgttcccag gctgttcaa tagt 24
<210> 16
<211> 44
5 <212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Constructo de oligonucleótidos GFP
<400> 16
10 guguuggcca uggaacauau aacaauaugc uaauguugu uaua 44
<210> 17
<211> 44
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> Constructo de oligonucleótidos GFP
<400> 17
uauaacaaua ugcuaaaugu uguuauagug uuggccaugg aaca 44
<210> 18
20 <211> 44
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Constructo de oligonucleótidos GFP
25 <400> 18
guguuggcca uggaacauau aacaauaugc uaauguugu uaua 44
<210> 19
<211> 52
<212> ARN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Constructo de oligonucleótidos GFP
<400> 19
guguuggcca uggaacaaua guauaacaau augcuaaaug uguuauagu au 52
35 <210> 20
<211> 58
<212> ARN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Constructo de oligonucleótidos GFP
 <400> 20

5 ggaauaguau aacaauaugc uaauguugu uauaguaucc cguguuggcc auggaaca 58
 <210> 21
 <211> 58
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> constructo de oligonucleótidos GFP
 <400> 21
 guuguuggcca uggaacagga auaguauaac aaauagcuaa auguuguuuau agauaccc 58
 <210> 22

15 <211> 58
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo de oligonucleótidos GFP

20 <400> 22
 ggaauaguau aacaauaugc uaauguugu uauaguaucc cguguuggcc auggaaca 58
 <210> 23
 <211> 41
 <212> ARN

25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Porción de reclutamiento
 <220>
 <221> características_misceláneas

30 <222> 7, 35
 <223> 'n' es a, c, g o u para formar un par de bases
 <400> 23
 ggaauanuau aacaauaugc uaauguugu uauanuaucc c 41
 <210> 24

35 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Porción de reclutamiento
 <220>
 <221> características_misceláneas
 5 <222> 9, 37
 <223> 'n' es a, c, g o u para formar un par de bases
 <400> 24
 guggaauanu auaacaauau gcuaaauguu guuauanuau cccac 45
 <210> 25
 10 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Porción de reclutamiento
 15 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> 5, 9, 37, 41
 <223> 'n' es a, c, g o u para formar pares de bases
 <400> 25
 20 guggnauanu auaacaauau gcuaaauguu guuauanuau nccac 45
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 26
 gcctggcacc attaaagaaa 20
 <210> 27
 30 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 27
 gcatcttgt atactgctct tgct 24
 <210> 28

<211> 66
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> oligonucleótido A1AT
 <400> 28
 ggaauaguau aacaauaugc uaauguugu uauaguaucc ccagucccuu ucucgucgau 60
 ggucag 66
 <210> 29
 <211> 15
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 29
 15 ccatcgacga gaaag 15
 <210> 30
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Sonda
 <400> 30
 catcgacaag aaag 14
 <210> 31
 25 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 31
 tccaggccgt gcataagg 18
 <210> 32
 <211> 16
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>

```

<223> Cebador
<400> 32
gccccagcag cttcag      16
<210> 33
5  <211> 161
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens
    <400> 33
    atacctccac tcagccatga ttatataccg agacctgaaa cccacaaatg tgctgctttt 60
    cacactgtat cccaatgctg ccatcattgc aaagattgct gactacggca ttgctcagta 120
    ctgctgtaga atggggataa aaacatcaga gggcacacca g      161
10 <210> 34
    <211> 21
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens
    <400> 34
15 gctgactaca gcattgctca g      21
    <210> 35
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
20 <400> 35
    Ala Asp Tyr Ser Ile Ala Gln
    1              5
    <210> 36
    <211> 21
    <212> ADN
25 <213> Homo sapiens
    <400> 36
    gctgactacg gcattgctca g      21
    <210> 37
    <211> 7
30 <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 37
    Ala Asp Tyr Gly Ile Ala Gln
    1              5
    <210> 38

```

<211> 70
 <212> ARN
 <213> Constructo de oligonucleótidos LRRK2
 <400> 38

5 **guggaauagu auaacaauau gcuaaauguu guuauaguau cccacacuga gcaaugccgu 60**
 agucagcaau 70

<210> 39
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Constructo de oligonucleótidos LRRK2
 <400> 39

guggaauagu auaacaauau gcuaaauguu guuauaguau cccacguacu gagcaaugcc 60
 guagucagca aucuu 75

<210> 40

15 <211> 66
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Constructo de oligonucleótidos LRRK2

20 <400> 40

ggaauaguau aacaauaugc uaaauguugu uauaguaucc cacugagcaa ugccguaguc 60
 agcaau 66

<210> 41
 <211> 71
 <212> ARN

25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Constructo de oligonucleótidos LRRK2
 <400> 41

ggaauaguau aacaauaugc uaaauguugu uauaguaucc cguacugagc aaugccguag 60
 ucagcaaucu u 71

30 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Cebador
 <400> 42
 gtttgagata cctccactca gc 22
 <210> 43
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 43
 aggtgcacga aaccctggtg 20

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de oligonucleótidos para la edición dirigida al sitio de un nucleótido en una secuencia de ARN diana en una célula eucariota, comprendiendo dicho constructo de oligonucleótidos:
 - (a) una porción de direccionamiento, que comprende una secuencia antisentido complementaria a parte del ARN diana; y
 - (b) una porción de reclutamiento que es: capaz de formar una estructura intramolecular de tallo-bucle; capaz de unirse y reclutar una enzima de edición de ARN presente de forma natural en dicha célula; y capaz de realizar la edición de dicho nucleótido.
2. Un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la porción de reclutamiento comprende una secuencia derivada de cualquiera de los siguientes restos:
 - (i) una secuencia de ARN que codifica el sitio GluR-B (R/G);
 - (ii) una secuencia de ARN que codifica el dominio de unión a enzima de edición de ARN de GluR-C, GluR-D o un receptor de serotonina 5-HT_{2C};
 - (iii) una estructura de bucle de ARN o ADN que comprende la secuencia (RY o YR)_nN_m(RY o YR)_n, en la que R es adenosina o guanosina, Y es uridina o citidina, N es adenosina, guanosina, citidina, uridina, o inosina, n es 3 o más, m es 4 o más y en la que N forma un bucle y las dos secuencias (RY)_n o (YR)_n forman una estructura de tallo doblemente trenzada a través del emparejamiento de bases complementarias;
 - (iv) una estructura de tallo-bucle de ADN que comprende la secuencia (CG)₃N¹-Nⁿ(CG)₃, en la que cada uno de N¹ a Nⁿ puede ser igual o diferente y seleccionado de guanosina, adenosina, timidina, citidina e inosina, y 'n' es entre 2 y 20;
 - (v) un bucle de pentanucleótido que tiene la secuencia: GCUMA, en el que G es guanosina, C es citidina, M es adenosina o citidina y U es uridina; y
 - (vi) un aptámero seleccionado para unirse a la enzima de edición de ARN.
3. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la porción de reclutamiento no es complementaria al ARN diana.
4. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la porción de direccionamiento comprende un nucleótido no complementario en una posición opuesta al nucleótido por editar en el ARN diana y en el que el nucleótido no complementario es una citidina o una uridina, preferiblemente una citidina.
5. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el nucleótido que es la diana para la edición es una adenosina.
6. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la enzima de edición tiene actividad hADAR1 o hADAR2.
7. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la porción de reclutamiento comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 6, 7, 20, 21, 22, 23 y 24.
8. El constructo de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que la porción de reclutamiento comprende la secuencia de nucleótidos: 5'-(AUAN^a)_nUAUAACAAUAUgcuaaAUGUUGUUAUA(N^bUAU)_n-3' en la que N^a y N^b son cada uno nucleótidos individuales que pueden ser A, G, C o U, con la condición de que N^a y N^b formen un par de bases de desajuste tras la formación de una estructura de tallo-bucle, y n es 1 o 0.
9. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la porción de reclutamiento comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 23, 24 o 25.
10. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la porción de reclutamiento comprende una secuencia de desoxioligonucleótidos que comprende la secuencia (CG)₃T₄(CG)₃ (SEQ ID NO: 5), en la que C es citidina, G es guanosina y T es timidina.
11. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que uno o más de los nucleótidos comprenden una modificación química.
12. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 11, en la que todas las uridinas opuestas a adenosinas en la secuencia de ARN diana que no son una diana para la edición son uridina 2'-metoxi-(2'-OMe).

13. El constructo de oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la longitud del oligonucleótido está entre 20 y 100 nucleótidos, preferiblemente entre 24 y 60 nucleótidos, más preferiblemente entre 30 y 50 nucleótidos.

- 5 14. Un constructo de oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en la edición dirigida al sitio de un nucleótido en un ARN diana en una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero, más preferiblemente una célula humana, a través de la acción de una enzima de edición de ARN presente de forma natural en dicha célula y capaz de realizar la edición de dicho nucleótido.

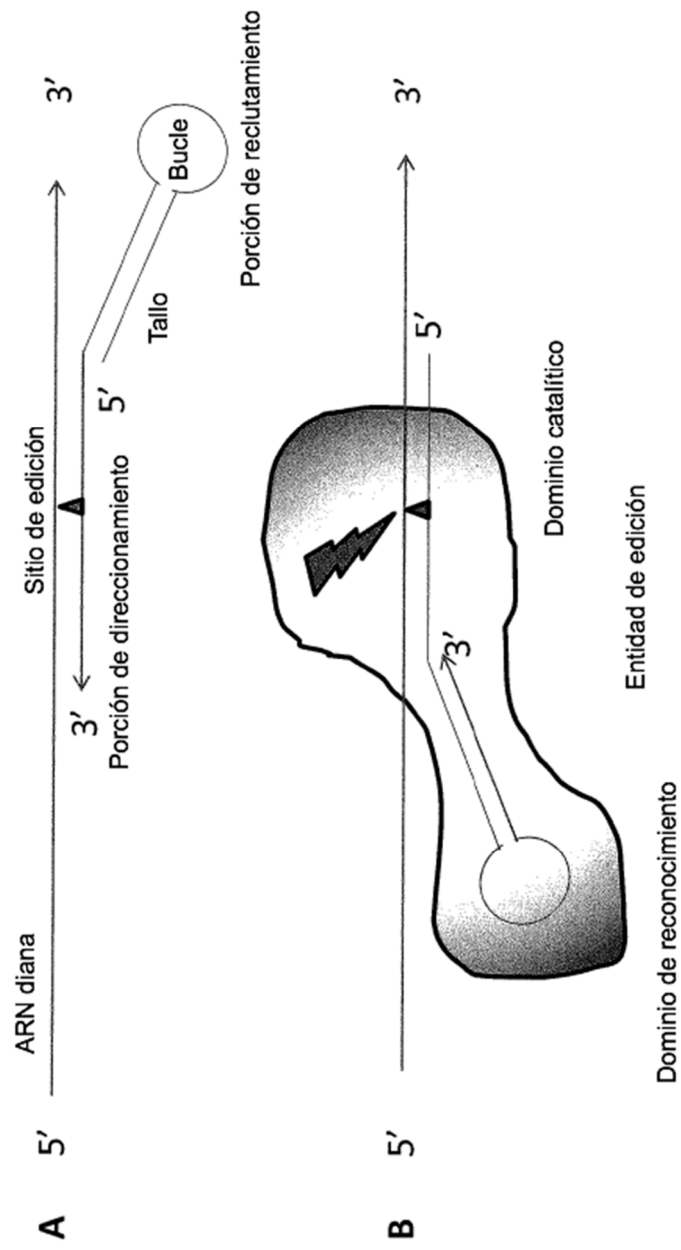


Fig. 1

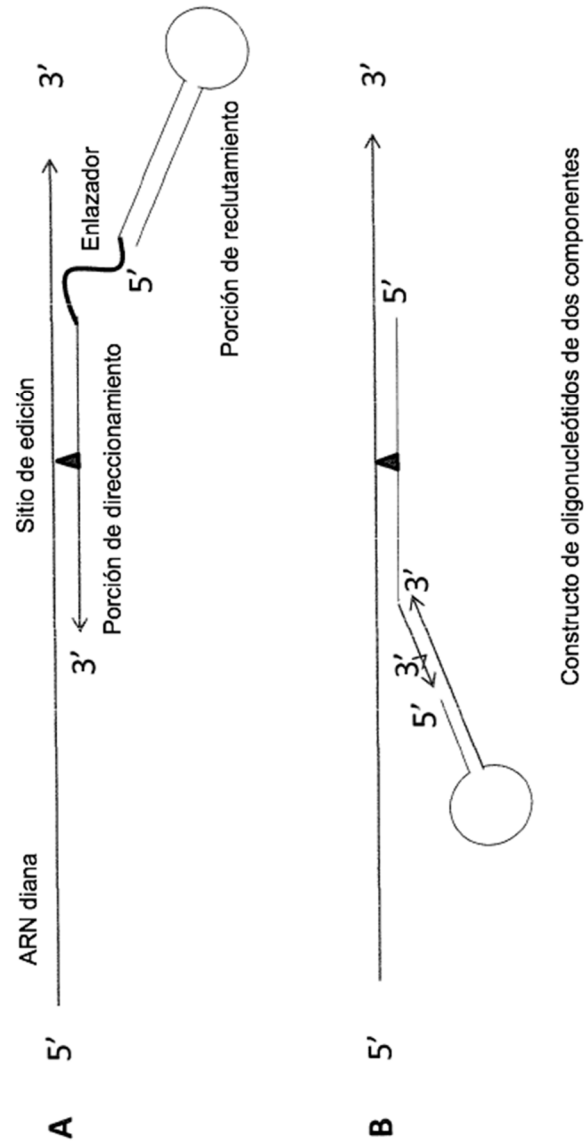


Fig. 2

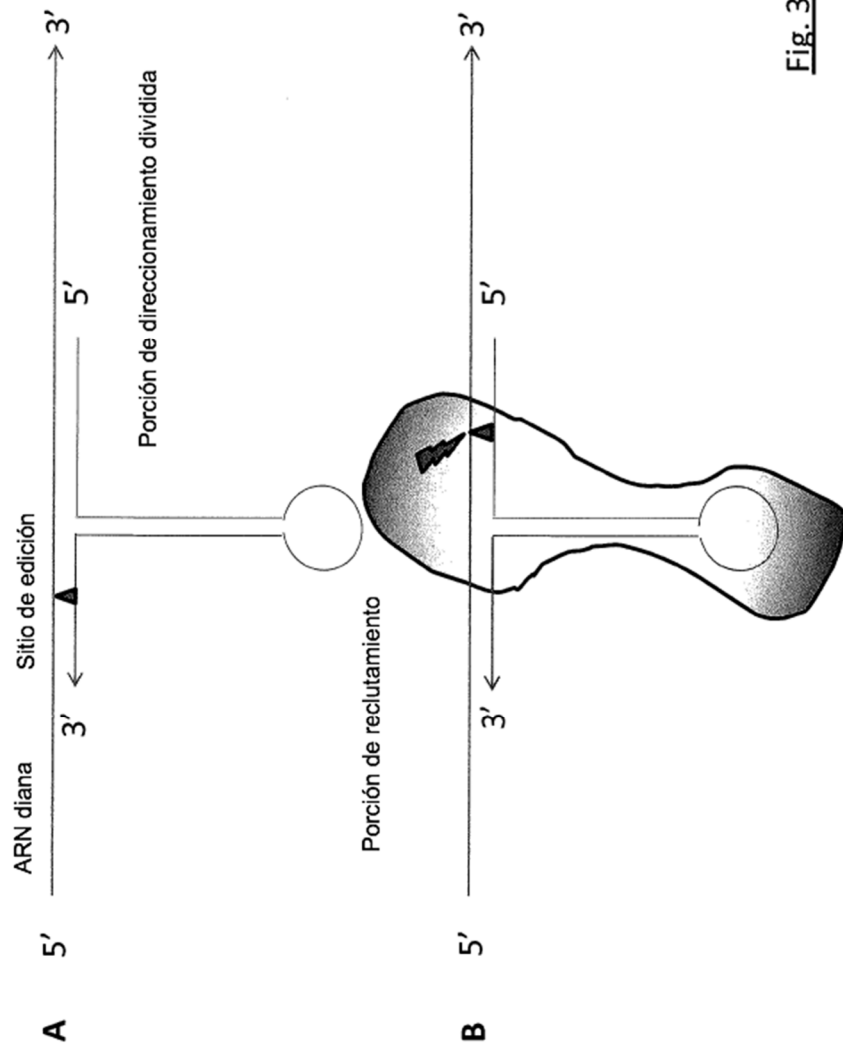


Fig. 3

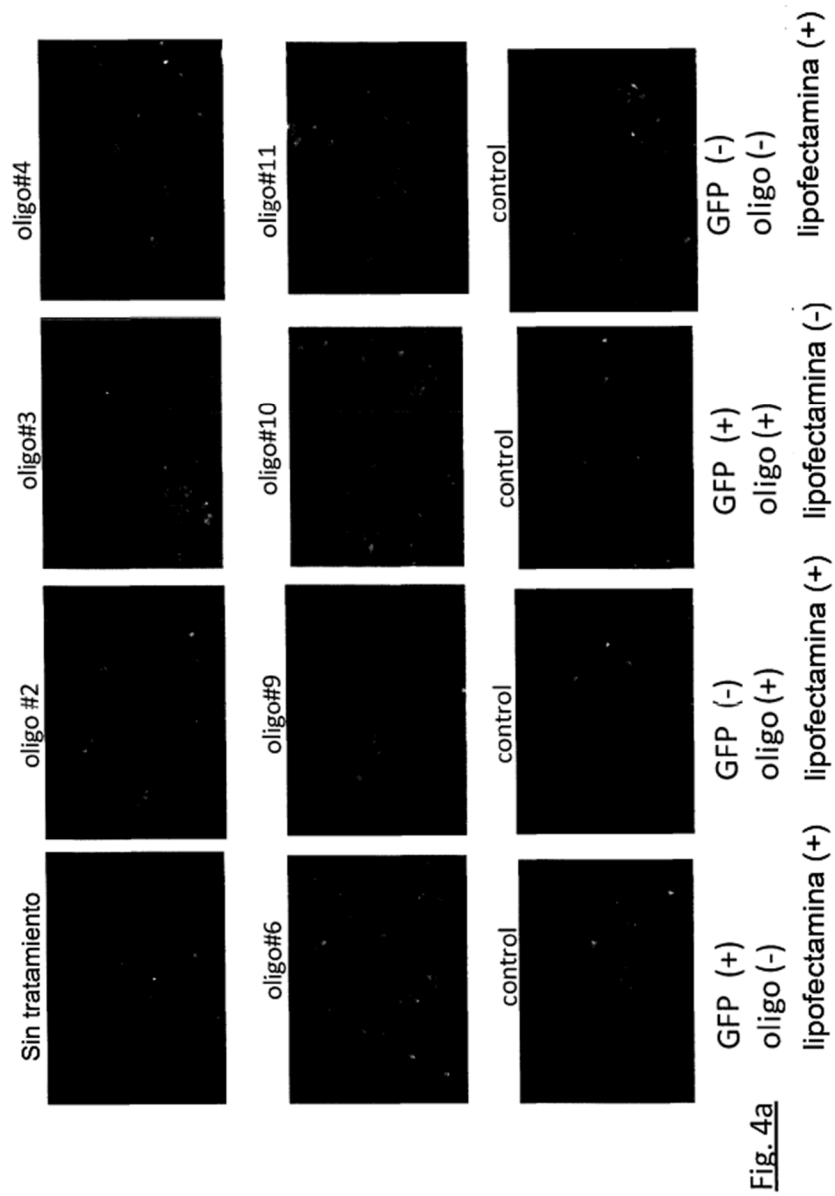


Fig. 4a

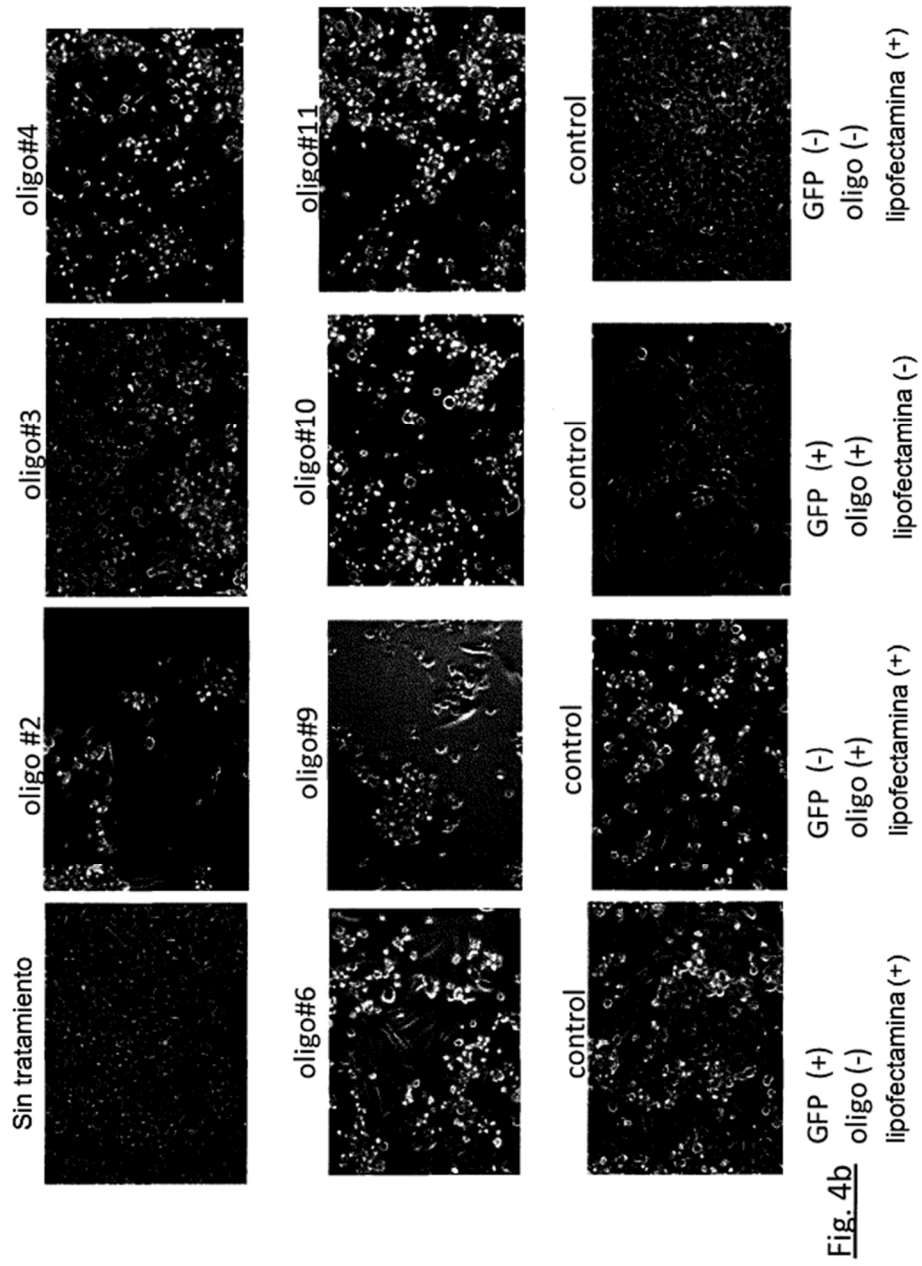


Fig. 4b

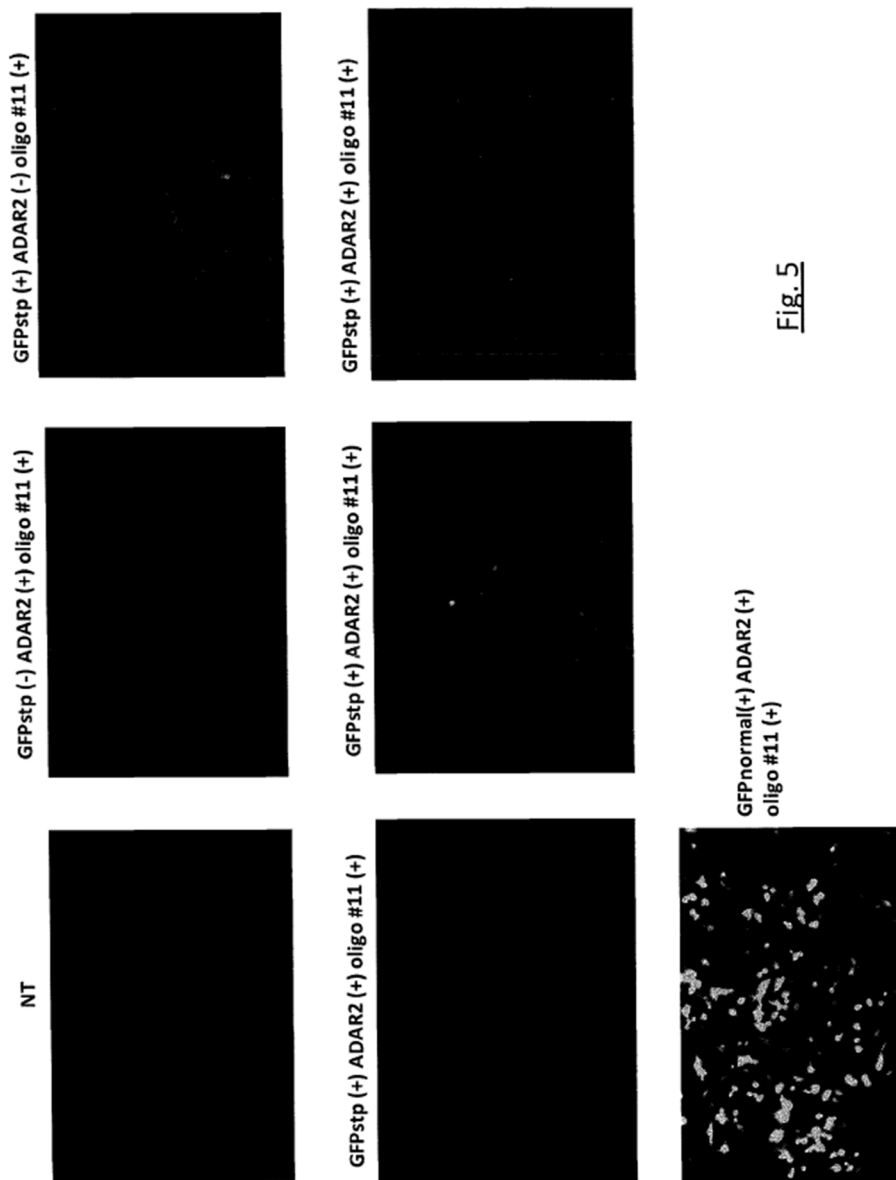


Fig. 5



Fig. 6

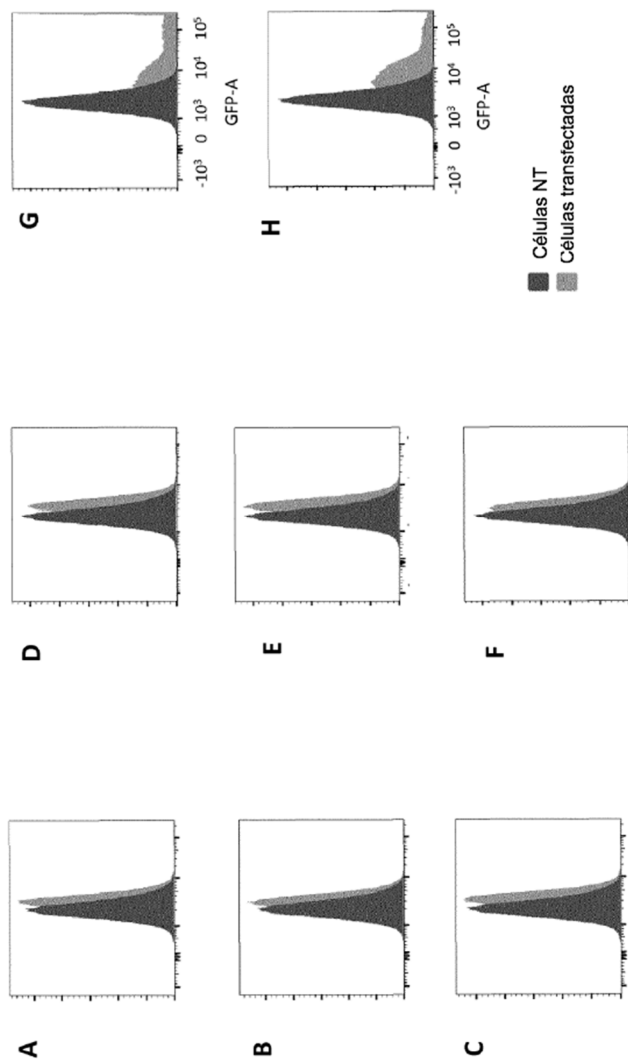


Fig. 7