ARN GUÍA ANTISENTIDO CON REGIÓN FUNCIONAL AÑADIDA PARA EDITAR ARN BLANCO

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un ARN guía para editar un ARN blanco mediante la guía de ADAR, particularmente un ARN guía antisentido con una región funcional añadida.

Antecedentes de la Invención

Existe un mecanismo de edición del ARN mediante una mutación de un solo nucleótido in vivo. En términos particulares, se observa más la edición de ARN de A a I, en la que la adenosina se convierte en inosina mediante la desaminación de la adenosina, y la cantidad de ARN a tener especificidad de blanco es tanta como 4 millones. ADAR (adenosina desaminasa que actúa sobre el ARN) se conoce como una enzima que convierte la adenosina en inosina utilizando un ARN bicatenario a manera de sustrato. ADAR tiene tres subtipos (ADAR1, ADAR2 y ADAR3) con diferentes genes, y ADAR tiene un dominio de unión a ARN de cadena doble en el extremo N y un dominio de desaminasa en el extremo C. ADAR2 edita de manera muy eficiente una subunidad GluR2 que constituye un receptor glutamato del ácido 3-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isooxazol propiónico (AMPA, por sus siglas en inglés) especialmente en el sistema nervioso central (Nature, 1996, Vol. 379, págs. 460-464). Dado que la inosina convertida de adenosina tiene una estructura similar a la de la guanosina, se reconoce como guanosina en la etapa de traducción y, como resultado, a veces se puede introducir una mutación de aminoácido en la región codificante. Un retrotransposón (FEBS Letters, 2006, Vol. 580, pp. 2301-2305) y un precursor de microARN (miARN) también se han informado como sustratos para ADAR en la región no codificante, y se ha sugerido que ADAR puede ser responsable de diversas funciones in vivo (Annu. Rev. Biochem., 2010, Vol. 79, pp. 321-349).

También se ha informado sobre una variante de ADAR con una mutación introducida artificialmente. Por ejemplo, se ha informado una variante de ADAR que puede reconocer no solo adenosina sino también citidina mediante la introducción de una mutación en ADAR, y también puede realizar la edición de ARN de C a U, en la que la citidina se cambia a uridina mediante la desaminación de citidina. (Science, 2019, Vol. 365, pp. 382-386).

En los últimos años, a medida que se edita el ARN usando ADAR de tipo salvaje y un ARN guía artificial, se han informado varios ARN guía para editar un ARN blanco que contiene una secuencia base de reclutamiento de ADAR derivada de GluR2 (WO 2016/097212, WO 2017/050306, WO 2017/010556, WO 2019/111957, Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, pp. 2797-2808, Nature Methods, 2019, Vol. 16, pp. 239-242).

Además, como una técnica de edición de ARN mediante el uso de un oligonucleótido antisentido, que es un ácido nucleico sintetizado artificialmente, como un ARN guía, también se ha informado una técnica para editar un ARN blanco mediante el uso de un oligonucleótido antisentido de 35 o más bases

complementarias a un ARNm que contiene adenosina para ser objetivo de edición y formar una cadena doble que tiene una estructura helicoidal incompleta con el ARNm y reclutar ADAR (PTL 1 a 3). Además, también se ha informado que la edición de un ARN blanco por ADAR se puede inducir mediante el uso de un ARN artificial de 100 o más bases (NPL 1). Además, también se ha informado la edición de un ARN blanco mediante una proteína de fusión de la proteína de recubrimiento de dominio de desaminasa de ADAR1-MS2 (MCP) y un sistema conjugado de ARN de antisentido-MS2 (NPL 2).

Por lo tanto, hay varios informes sobre la edición de ARN usando un oligonucleótido antisentido. Sin embargo, para utilizar un ARN guía de edición de ARN blanco a manera de un producto farmacéutico, es necesario que el ARN guía muestre una eficiencia de edición determinada en una célula, pero no se ha estudiado suficientemente una técnica de edición de ARN que tenga una gran eficiencia de edición.

Por otro lado, se conocen secuencias de ARN que tienen diversas funciones tales como un ARN nuclear pequeño (ARNnp), un ARN ribosómico (ARNr), un ARN que tiene una estructura de orden superior tal como una estructura cuádruplex de guanina o una estructura de asa en horquilla, y también se ha informado que algunas de ellas se agregan a un ARN tal como un ARN guía o un oligonucleótido antisentido.

En un eucariota, un ARNnp actúa en el empalme o procesamiento de un ARN mensajero precursor (pre-ARNm) a través de una ribonucleoproteína (RNP). En términos particulares, 5 tipos de RNPnp (U1, U2, U4, U5 y U6) constituyen un empalme implicado en el empalme, y los ARNnp se expresan de forma abundante y estable en casi todas las células eucariotas (Biological Chemistry, 2018, Vol. 399, pp. 1265-1276).

El ARNnp U6 se expresa de forma estable y abundante en todas las células humanas y forma una ribonucleoproteína U6 RNPnp en el núcleo. U6 RNPnp constituye un espliceosoma y controla el empalme en un precursor de ARN. El elemento de iniciación de la transcripción corriente arriba de un gen de ARNnp U6 se conoce como un promotor de polimerasa III (polIII) potente que expresa un ARN dado (una ribozima, un ácido ribonucleico antisentido, un aptámero de ARN o similares) (NPL 3). Los NPL 3 a 5 informan que en un casete de expresión de ARN pequeño compuesto por una secuencia que codifica U6 (en lo sucesivo, un casete de expresión que contiene una secuencia que codifica U6 descrita en los NPL 3 a 5 se denomina "casete U6"), la estructura de orden superior de la secuencia U6 funciona para localizar el ARN insertado en el núcleo. El casete U6 contiene una secuencia de asa en horquilla artificial inmediatamente aguas arriba de una secuencia terminadora de poli(U) como un dispositivo para expresar de forma estable y fuerte un ARN pequeño. Una secuencia de asa de tallo artificial que contiene un tetrabucle formado por una secuencia de ARN UNCG tiene una estructura de asa de tallo más termodinámicamente estable (Nucleic Acids Research, 1991, Vol. 19, pp. 5901-5905). Se sugiere que la estructura de asa en horquilla estable muestra resistencia a la actividad de exonucleasa 3'-5' y estabiliza la transcripción del casete U6 (NPL 3 a 5).

El ARNnp U1 está compuesto por una secuencia complementaria a una secuencia donante de empalme (unión del exón 3’ e intrón 5’) y una secuencia que tiene una estructura similar a un trébol. Se

sabe que el ARNnp de U1 quimérico en el que la secuencia donante de empalme de ARNnp de U1 se ha sustituido con una secuencia antisentido de un gen blanco puede inducir la omisión de exones (Mol. Ther., 2010, Vol. 18, pp. 1675-1682, Proc. Nat. Acad. Sci., 2002, Vol. 99, pp. 9456-9461). Una secuencia de 400 bases aguas arriba de un gen de ARNnp U1 contiene un promotor polII y también se usa para la transcripción de ARNnp U1 quimérico (Mol. Ther., 2004, Vol. 10, págs. 191-199).

U7 ARNnp es responsable del procesamiento de un pre-ARNm de histona. El ARNnp U7 se compone de una secuencia complementaria a un pre-ARNm de histona 3, un sitio de unión a la proteína Sm y una secuencia de bucle madre. Al agregar una mutación, el sitio de unión de la proteína Sm se vuelve capaz de unirse a las proteínas D1 y D2 que forman un espliceosoma en lugar de la proteína Lsm original (Cell. Mol. Life Sci., 2004, Vol. 61, pp. 2560-2570). Se ha informado que un ARNnp U7 quimérico mutante compuesto por una secuencia antisentido de un gen blanco, un sitio de unión a la proteína Sm mutante y una secuencia de bucle de tallo puede inducir la omisión de exón (Nat. Med., 2014, Vol. 20, pp. 992-1000). Una secuencia de 270 bases cadena arriba de un gen de ARNnp U7 contiene un promotor de polimerasa II (polII) y también se usa para la transcripción del ARNnp U7 quimérico mutante (Science, 2004, Vol. 306, págs. 1796-1799).

Un ribosoma es un orgánulo celular que sintetiza una proteína en una célula y se compone de dos subunidades. La subunidad grande de un eucariota se compone de ARNr 28S, 5.8S y 5S y varias proteínas, que se ensamblan en el nucléolo y luego se transportan al citoplasma. El ARNr 5S tiene una estructura secundaria compuesta por 5 hélices y 5 bucles. NPL 5 informa que cuando una secuencia antisentido unida a 5S ARNr se transcribe desde un promotor polIII aguas arriba de un gen 5S utilizando un casete de expresión de una secuencia antisentido que contiene una secuencia de 5S ARNr, se localiza en el citoplasma (en adelante, el casete de expresión que contiene ARNr 5S descrito en NPL 5 se denomina "casete 5S"). De manera similar al casete U6, el casete 5S tiene una secuencia de asa en horquilla artificial inmediatamente anterior a la secuencia terminadora.

La estructura cuádruplex de guanina (Gq: G-cuádruplex) es una secuencia repetitiva que contiene guanina, que se conoce como una estructura de orden superior de ADN o ARN termodinámicamente estable en el entorno in vivo. En la formación de la estructura de orden superior, se necesita un catión monovalente. Gq se informó originalmente como una secuencia que se encuentra en un telómero (Cell, 1989, Vol. 59, pp. 871-880). Las funciones conocidas de Gq incluyen la traducción transcripcional, la regulación del epigenoma y similares (EMBO Reports, 2015, Vol. 16, pp. 910-922). Se ha informado que para un ARN guía Cas9, la eficiencia de edición del genoma se mejora mediante la adición de Gq al extremo 3'(NPL 6). Además, se ha informado que la eficiencia de la supresión de la expresión génica por una enzima de degradación de ARN se incrementa mediante la adición de Gq a un oligonucleótido antisentido (PTL 4).

Se sabe que la estructura de bucle madre, que es una estructura de orden superior de un ácido nucleico que se encuentra en un ARN pequeño, contribuye a una función de regulación traductorial (Cell.

Mol. Life Sci., 2006, Vol. 63, pp. 901-908). Una secuencia BoxB derivada del fago λ tiene una estructura de bucle de tallo y muestra una fuerte afinidad por la proteína λN (Biol. Cell. 2008, Vol. 100, pp. 125-138, J. Am. Chem. Soc., 2002, Vol. 124, págs. 10966-10967). Se ha informado que para reclutar ADAR a un ARN guía mediante la utilización de esta propiedad, se agrega una secuencia BoxB al ARN guía y la proteína λN se fusiona al ADAR (NPL 7). Además, PTL 5 describe que para estabilizar un ARN guía diseñado en base a la secuencia de GluR2, se puede agregar una secuencia BoxB al extremo 3' del ARN guía, pero NPL 8 describe que el efecto de la estabilización por la adición de la secuencia de BoxB al ARN guía era pequeña.

Tal como se describió anteriormente, se han informado secuencias de ARN que tienen diversas funciones, pero no se ha informado que se añada una secuencia de ARN que tiene una función para contribuir a la actividad de edición de un ARN guía que edita un ARN blanco.

<u>Listado de Referencias</u>

Literatura Relacionada con Patentes

Literatura de Patentes 1: WO 2017/220751

Literatura de Patentes 2: WO 2018/041973

Literatura de Patentes 3: WO 2018/134301

Literatura de Patentes 4: WO 2017/188898

Literatura de Patentes 5: WO 2017/050306

Literatura No Relacionada con Patentes

Literatura No de Patentes 1: Nat. Biotechnol., 2019, Vol. 37, pp. 1059-1069

Literatura No de Patentes 2: Protein Eng. Des. Sel., 2018, Vol. 1, pp. 471-478

Literatura No de Patentes 3: Gene Ther., 1997, Vol. 4, pp. 45-54

Literatura No de Patentes 4: Nat. Biotechnol., 2002, Vol. 20, pp. 505-508

Literatura No de Patentes 5: Mol. Ther., 2003, Vol. 7, pp. 237-247

Literatura No de Patentes 6: Chem. Commun., 2018, Vol. 54, pp. 2377-2380

Literatura No de Patentes 7: Nucleic Acids Research, 2016, Vol. 44, p. e157

Literatura No de Patentes 8: Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, pp. 2797-2808

<u>Breve Descripción de la Invención</u>

PROBLEMÁTICA TÉCNICA

Se proporciona un ARN guía antisentido para editar un ARN blanco mediante ADAR y un ácido nucleico que lo codifica.

SOLUCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

Como resultado de estudios intensivos sobre un ARN guía para editar un ARN blanco mediante la guía de ADAR, los inventores de la presente descubrieron que un ARN guía que contiene una región antisentido a la que se une al menos una región funcional y no contiene sustancialmente una secuencia base

de reclutamiento de ADAR muestra una alta eficiencia de edición en una célula y, por lo tanto, completó la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a las siguientes etapas [1] a [23].

[1] Un ARN guía para editar un ARN blanco mediante ADAR, que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR.

[2] El ARN guía de acuerdo con [1], en donde la al menos una región funcional está directamente unida a la región antisentido o unida a esta a través de un enlazador.

[3] El ARN guía de acuerdo con [1] o [2], en donde la región antisentido tiene una base para formar un par de bases no emparejadas con el ARN blanco.

[4] El ARN guía de acuerdo con cualquiera de [1] a [3], en donde la región funcional es una región compuesta por una secuencia base que tiene una o más funciones entre funciones que incluyen estabilización del ARN guía, localización del ARN guía al núcleo, localización del ARN guía al citoplasma, promoción de la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido, inhibición de la formación de cadena doble no específica por la región antisentido y estabilización de un complejo formado del ARN blanco y la región antisentido.

[5] El ARN guía de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en donde la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp, una región compuesta por una secuencia de ARNr, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla o cualquier combinación de estas.

[6] El ARN guía de acuerdo con [5], en donde la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla.

[7] El ARN guía de acuerdo con [6], en donde la región compuesta por una secuencia de ARNnp es una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 o una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7.

[8] El ARN guía de acuerdo con [5], en donde la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNr y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla.

[9] El ARN guía de acuerdo con [8], en donde la región compuesta por una secuencia de ARNr es una región compuesta por una secuencia de ARNr 5S.

[10] El ARN guía de acuerdo con [5], en donde la región funcional es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla, o una combinación de las mismas.

[11] El ARN guía de acuerdo con cualquiera de [1] a [5], en donde el ARN guía está compuesto por una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región funcional adicional opcionalmente contenida y un enlazador opcionalmente contenido, y la región antisentido, la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina y la región funcional adicional opcionalmente contenida están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3'.

[12] El ARN guía de acuerdo con cualquiera de [1] a [5], en donde el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, una región antisentido, una región funcional adicional opcionalmente contenida y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla y la región antisentido están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3'.

[13] Un sistema para editar un ARN blanco, que incluye el ARN guía de acuerdo con cualquiera de [1] a [12] y ADAR.

[14] Un ácido nucleico, que codifica el ARN guía de acuerdo con cualquiera de [1] a [12].

[15] Un vector de expresión, que contiene un ácido nucleico que codifica el ARN guía de acuerdo con cualquiera de [1] a [12].

[16] El vector de expresión de acuerdo con [15], que contiene además un ácido nucleico que codifica para ADAR.

[17] El vector de expresión de acuerdo con [16], en donde el ADAR es ADAR1 o ADAR2.

[18] Una célula hospedera en la que se ha introducido el vector de expresión de acuerdo con cualquiera de [15] a [17].

[19] Un método para producir un vector de expresión, que incluye una etapa de cultivo de la célula hospedera de acuerdo con [18].

[20] Una composición farmacéutica, que contiene el vector de expresión de acuerdo con cualquiera de [15] a [17] y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[21] Una composición farmacéutica, que contiene el vector de expresión de acuerdo con [15], un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para ADAR, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[22] Un método para editar un ARN blanco, que incluye una etapa de introducción de un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de acuerdo con cualquiera de [1] a [12] en una célula, un virus o lo similar.

[23] Un polinucleótido para editar un ARN blanco mediante ADAR, que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y donde el polinucleótido no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de

ADAR.

Efectos Ventajosos de la Invención

Se puede utilizar un ARN guía antisentido con una región funcional añadida a manera de un ARN guía para editar un ARN blanco.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se describirá detalladamente a continuación, pero la presente invención no se limita a la misma. Si el término utilizado en la presente no se define específicamente, se utilizará en un sentido generalmente aceptado por los expertos en la materia.

ARN guía de la presente invención

La presente invención proporciona un ARN guía para editar un ARN blanco mediante ADAR, que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR (en lo sucesivo, también denominada “el ARN guía de la presente invención”). En la presente invención, el "ARN guía para editar un ARN blanco mediante ADAR" se refiere a una molécula de ARN que tiene una región que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco y que guía ADAR al ARN blanco.

1. ARN blanco

En la presente invención, el "ARN blanco" se refiere a un ARN dirigido para su edición por el ARN guía de la presente invención. En una parte del ARN blanco, se contiene adenosina que se convertirá en inosina o citidina que se convertirá en uridina. En algunas modalidades, el ARN blanco es cualquier secuencia de ARN, en la que se contiene adenosina y la función celular y/o la expresión génica se pueden controlar mediante la conversión de la adenosina en inosina. En otras modalidades, el ARN blanco es cualquier secuencia de ARN, en la que se contiene citidina y la función celular y/o la expresión génica se pueden controlar mediante la conversión de la citidina en uridina. En la presente, la frase “la función celular se puede controlar” significa que, debido a un cambio en la función de un ARN, la traducción de este y la función de una proteína en una célula que tiene un ARN blanco, la función de la célula se puede controlar. La frase “la expresión génica puede controlarse” significa que la expresión de un gen que tiene un ARN blanco puede controlarse. El ARN blanco puede estar presente en un ARN que contiene un exón, un intrón, una región codificante o varias regiones no traducidas en un exón (por ejemplo, un retrotransposón, un microARN (miARN), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN ribosómico (ARNr), etc.). El ARN blanco puede estar presente en un ARN contenido en una célula eucariota, una célula de mamífero, un virus, una célula procariota, una bacteria, un fago o similares.

2. Región antisentido

El ARN guía de la presente invención contiene una región antisentido. En la presente invención, la

"región antisentido" se refiere a una región que tiene una secuencia base complementaria a una parte del ARN blanco y compuesta por una secuencia para formar una cadena doble con el ARN blanco. La longitud de la secuencia base que constituye la región antisentido es, en algunas modalidades, 10 bases a 100 bases, 10 bases a 80 bases, 10 bases a 60 bases, o 10 bases a 40 bases, en algunas modalidades, 15 bases a 40 bases, en algunas modalidades, 10 bases a 38 bases, en algunas modalidades, 15 a 38 bases, y en algunas modalidades, 18 a 38 bases. En algunas realizaciones, la región antisentido puede contener una base para formar un par de bases que no coinciden o una base para formar un par de bases oscilantes con el ARN blanco. En algunas modalidades, la región antisentido puede contener una base para formar un par de bases no emparejadas con el ARN blanco.

El "par de bases no coincidente" tal como se usa en el presente documento es un par de bases GA, CA, UC, AA, GG, CC o UU. El "par de bases oscilantes", tal como se usa en la presente, es un par de bases G-U, I-U, I-A o I-C. En algunas modalidades, la región antisentido es una región compuesta por una secuencia base que tiene una base para formar un par de bases no emparejadas con adenosina o citidina contenida en una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco. En algunas realizaciones, la región antisentido es una región compuesta por una secuencia de bases que tiene una base para formar un par de bases que no coinciden con la adenosina contenida en una porción del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco. En algunas modalidades, la región antisentido es una región compuesta por una secuencia base que tiene citidina como una base para formar un par de bases no emparejadas con adenosina contenida en una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco.

Los expertos en la materia pueden diseñar adecuadamente la secuencia base que constituye la región antisentido teniendo en cuenta la secuencia del ARN blanco, la longitud de la base, la posición de la base que no coincide formada con el ARN blanco, el efecto fuera del blanco o similares. Con el fin de mejorar la eficiencia de edición del ARN blanco mediante ADAR a adenosina o citidina, la secuencia base que constituye la región antisentido también se puede diseñar para formar un par de bases no emparejadas o un par de bases oscilantes con la adenosina o citidina (ARN, 2001, Vol. 7, págs. 846-858, Nat. Biotechnol., 2019, Vol. 37, pp. 1059-1069).

La "ASR", tal como se usa en la presente, denota la región antisentido.

3. Región funcional

El ARN guía de la presente invención contiene al menos una región funcional. En la presente invención, la "región funcional" se refiere a una región compuesta por una secuencia base que tiene una o más funciones entre funciones que incluyen estabilización del ARN guía, localización del ARN guía al núcleo, localización del ARN guía al citoplasma, promoción de la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido, inhibición de la formación de cadena doble no específica por la región antisentido, estabilización de un complejo formado a partir del ARN blanco y la región antisentido y

similares. En algunas modalidades, la región funcional es una región compuesta por una secuencia base que tiene una o más funciones entre funciones que incluyen estabilización del ARN guía, localización del ARN guía al núcleo, localización del ARN guía al citoplasma, promoción de la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido, inhibición de la formación de cadena doble no específica por la región antisentido y estabilización de un complejo formado a partir del ARN blanco y la región antisentido,

En algunas realizaciones, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, (a) una región compuesta por una secuencia de bases que promueve la estabilización del ARN guía, (b) una región compuesta por una secuencia de bases que promueve la localización de el ARN guía al núcleo, (c) una región compuesta por una secuencia de bases que promueve la localización del ARN guía en el citoplasma, (d) una región compuesta por una secuencia de bases que promueve la formación de doble cadena entre el ARN blanco y el antisentido (e) una región compuesta por una secuencia de bases que inhibe la formación de doble cadena no específica por parte de la región antisentido, o (f) una región compuesta por una secuencia de bases que promueve la estabilización de un complejo formado por el ARN blanco y el ARN antisentido región, o una región compuesta por una secuencia de bases que tiene dos o más funciones entre las funciones descritas en (a) a (f) anteriores. La expresión "la región funcional tiene una o más funciones entre estas" a veces se denomina colectivamente "que tiene una función". Además, la expresión "que tiene las funciones descritas en (a), (b) y (d)" a veces se denomina colectivamente "que tiene la función de una secuencia de ARNnp". La expresión "que tiene las funciones descritas en (a) y (c)" a veces se denomina colectivamente como "que tiene la función de una secuencia de ARNr".

En la presente descripción, "promover la estabilización del ARN guía" se refiere a impartir resistencia a una enzima de degradación del ARN. La función se puede evaluar mediante la medición de la cantidad residual del ARN guía en presencia de una enzima de degradación de ARN, la cantidad residual del ARN guía en una célula bajo inhibición de transcripción después de la introducción de un ácido nucleico que codifica para el ARN guía en la célula, o lo similar mediante un método conocido. Por ejemplo, se puede evaluar mediante el método descrito en el Ejemplo 10. La "promoción de localización del ARN guía al núcleo" se refiere a promover la transferencia y localización del ARN guía introducido en una célula al núcleo. La función se puede evaluar mediante la detección de la distribución intracelular o cantidad del ARN guía mediante un método conocido. Por ejemplo, puede confirmarse mediante hibridación in situ (Mol. Ther., 2003, Vol. 7, pp. 237-247). La "promoción de localización del ARN guía al citoplasma" se refiere a promover la retención del ARN guía introducido en una célula en el citoplasma. La función se puede evaluar mediante la detección de la distribución intracelular o cantidad del ARN guía mediante un método conocido. Por ejemplo, se puede confirmar mediante hibridación in situ (Mol. Ther., 2003, Vol. 7, pp. 237-247). La "promoción de la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido" se refiere a mejorar la afinidad entre el ARN blanco y la región antisentido. La función puede evaluarse mediante un ensayo de afinidad usando un método conocido (BMC Botech. 2008, Vol. 8, artículo número 48). La

"inhibición de la formación de cadena doble no específica por la región antisentido" se refiere a la reducción de la formación de cadena doble no específica (en lo sucesivo, también denominada "efecto fuera del blanco"). La función se puede evaluar mediante un método conocido tal como secuenciación de ARN (Nat. Biotechnol., 2019, Vol. 37, pp. 657-666). La "promoción de estabilización de un complejo formado a partir del ARN blanco y la región antisentido" se refiere a mantener el estado de un complejo que contiene una cadena doble formada a partir del ARN blanco y la región antisentido. La función se puede evaluar midiendo la cantidad residual de una cadena doble formada a partir del ARN blanco y la región antisentido en presencia de una enzima de degradación de ARN que degrada un ARN de una cadena híbrida de ADN/ARN mediante un método conocido. Por ejemplo, se puede evaluar midiendo la cantidad residual de una cadena doble formada por el ARN blanco y el ARN guía compuesto por una secuencia de ADN en presencia de ARNasa H (Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1996, Vol. 7, pp. 86-93).

En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la estabilización del ARN guía es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de orden superior termodinámicamente estabilizada. La estructura de orden superior termodinámicamente estabilizada no está limitada siempre y cuando sea una estructura que muestre resistencia a la actividad de nucleasa. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la estabilización del ARN guía es una región compuesta por una secuencia de ARN nuclear pequeño (ARNnp), una región compuesta por una secuencia de ARN ribosómico (ARNr), una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura dúplex, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura tríplex, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla o similares. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la estabilización del ARN guía es una región compuesta por una secuencia de ARNnp, una región compuesta por una secuencia base para formar un cuádruplex de guanina (Gq: G-cuádruplex), o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla.

En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la localización del ARN guía en el núcleo es una región compuesta por una secuencia base derivada de un ARN pequeño. En algunas realizaciones, la región compuesta por una secuencia de bases que promueve la localización del ARN guía en el núcleo es una región compuesta por una secuencia de ARNnp.

En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la localización del ARN guía en el citoplasma es una región compuesta por una secuencia base derivada de un ARN pequeño. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la localización del ARN guía en el citoplasma es una región compuesta por una secuencia base que promueve la localización del ARN guía en un ribosoma y, en algunas modalidades, una región compuesta por una secuencia de ARNr. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la

localización del ARN guía en el citoplasma es una región compuesta por una secuencia de ARN de transferencia (ARNt). En algunas realizaciones, la región compuesta por una secuencia de bases que promueve la localización del ARN guía en el citoplasma es una región compuesta por una secuencia de ARN 7SL que es una secuencia de ARN derivada de una partícula de reconocimiento de señal (SRP).

En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido es una región compuesta por una secuencia base que promueve termodinámica y conformacionalmente la formación de una cadena doble y un complejo que contiene una cadena doble (Nat. Biotechnol., 2019, Vol. 37, pp. 657-666). En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido es una región compuesta por una secuencia de ARNnp, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la región compuesta por una secuencia de bases que promueve la formación de doble cadena entre el ARN blanco y la región antisentido es una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1, una región compuesta por un ARNnp U7 secuencia, o una región compuesta por una secuencia de bases para formar una estructura de asa en horquilla, o cualquier combinación de las mismas.

En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que inhibe la formación de doble cadena no específica por la región antisentido es una región compuesta por una secuencia base que reduce termodinámica y conformacionalmente el efecto fuera del blanco. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que inhibe la formación de doble cadena no específica por la región antisentido es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla (Chem. Commun., 2018, Vol. 54, pp. 2377-2380).

En algunas realizaciones, la región compuesta por una secuencia de bases que promueve la estabilización de un complejo formado por el ARN blanco y la región antisentido es una región compuesta por una secuencia de bases que muestra resistencia a la actividad de la nucleasa mediante la estabilización termodinámica y conformacional de una cadena doble y un complejo que contiene una cadena doble (Antival Chemistry & Chemotherapy, 1996, Vol. 7, pp. 86-93). En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base que promueve la estabilización de un complejo formado por el ARN blanco y la región antisentido es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla.

En algunas realizaciones, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp, una región compuesta por una secuencia de ARNr, una región compuesta por una secuencia de bases para formar un cuádruplex de guanina (Gq: Estructura G-cuádruplex), y una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, una región compuesta por una secuencia de ARN derivada de SRP, una región compuesta por una secuencia

de ARN no codificante larga (ARNlnc), una región compuesta por una secuencia de ARNt, una región compuesta por una secuencia de ARN nucleolar pequeño (ARNnop) o una región compuesta por una secuencia de miARN o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp, una región compuesta por una secuencia de ARNr, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura Gq o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla o cualquier combinación de estas.

En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp y una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla. La región, que está compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa de tallo, y se puede utilizar en combinación con la región compuesta por una secuencia de ARNnp, es, en algunas modalidades, una región compuesta por una secuencia de asa de tallo artificial. La secuencia de asa en el tallo artificial es una secuencia para formar una estructura de asa en el tallo producida artificialmente, y, por ejemplo, una secuencia de asa en el tallo artificial (denominada "secuencia STL" en la presente descripción) contenida en un casete U6 o un casete 5S (Gene Ther., 1997, Vol. 4, pp. 45-54, Nat. Biotechnol., 2002, Vol. 20, pp. 505-508, Mol. Ther., 2003, Vol. 7, pp. 237-247). La región, que está compuesta por una secuencia de bases para formar una estructura de bucle de tallo, y puede usarse en combinación con la región compuesta por una secuencia de ARNnp, es, en algunas realizaciones, una región compuesta por una secuencia STL. En algunas realizaciones, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp y una región compuesta por una secuencia de bucle de tallo artificial. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp y una región compuesta por una secuencia STL.

La región compuesta por una secuencia de ARNnp usada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base de un ARNnp bien conocida por los expertos en la técnica, y puede contener parcialmente una modificación en la secuencia base de un ARNnp natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp y/o pueda ser una secuencia parcial de la secuencia base de un ARNnp natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp. Por ejemplo, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1, una secuencia de ARNnp U2, una secuencia de ARNnp U4, una secuencia de ARNnp U5, una secuencia de ARNnp U6, una secuencia de ARNnp U7, una secuencia de ARNnp U11, una secuencia de ARNnp U12, una secuencia de ARNnp U4atac o una secuencia de ARNnp U6atac o cualquier combinación de estas. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1, una secuencia de ARNnp U2, una secuencia de ARNnp U4,

una secuencia de ARNnp U5, una secuencia de ARNnp U6 o una secuencia de ARNnp U7 o cualquier combinación de estas. En algunas realizaciones, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 o una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7.

En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 o una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 y una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 y una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 y una región compuesta por una secuencia STL. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 y una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 y una región compuesta por una secuencia STL. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 y una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 y una región compuesta por una secuencia STL.

La región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base de ARNnp U6 y puede contener parcialmente una modificación en la secuencia base de ARNnp U6 natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp y/o pueda ser una secuencia parcial de ARNnp U6 natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 utilizada en la presente invención es una región compuesta por una secuencia parcial de la secuencia base de ARNnp U6 y, en algunas modalidades, una región compuesta por una secuencia base desde el sitio de inicio de la

transcripción hasta la posición 27 de la secuencia base de ARNnp U6. En el ARN guía de la presente invención, la región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 se puede utilizar en combinación con una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp. Cuando se utiliza la región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial, la región antisentido se inserta entre la región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 y la región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 1 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 1, y que tiene la función de la secuencia de ARNnp. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial utilizada en la presente invención es una región compuesta por una secuencia STL, y en algunas modalidades, una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2, y que forma una estructura de asa en horquilla.

La región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base de ARNnp U1 y puede contener parcialmente una modificación en la secuencia base de ARNnp U1 natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp y/o pueda ser una secuencia parcial de ARNnp U1 natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp. En el ARN guía de la presente invención, la región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 se puede utilizar mediante la unión de la región antisentido a la secuencia de ARNnp U1, o se puede utilizar mediante la inserción de la región antisentido en la secuencia de ARNnp U1 siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp. Cuando la región antisentido se inserta en la secuencia de ARNnp U1, la secuencia de ARNnp U1 se divide en dos regiones cualesquiera, y la región antisentido se inserta entre ellas. La inserción de la región antisentido en la secuencia de ARNnp U1 se puede llevar a cabo mediante la sustitución de una parte de la secuencia de ARNnp U1 con la región antisentido. En algunas modalidades, una secuencia base de la posición 3 a la posición 10 del sitio de inicio de la transcripción de la secuencia base de la secuencia de ARNnp de U1 puede sustituirse con la región antisentido. En la inserción de la región antisentido en la secuencia de ARNnp U1, en algunas modalidades, la región antisentido se puede insertar en la posición 3 del sitio de inicio de la transcripción de la secuencia de ARNnp U1 compuesta por una secuencia base en la que se han eliminado 8 bases de la posición 3 a la posición 10 del sitio de inicio de la transcripción de la secuencia base de la secuencia de ARNnp U1. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 1 o una secuencia base, en la que 1 a 20 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 3, y que

tiene la función de la secuencia de ARNnp. (11) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base, en la que 8 bases de la posición 3 a la posición 10 del sitio de inicio de la transcripción se han eliminado en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 3, y que tiene la función de la secuencia de ARNnp,

La región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base de ARNnp U7 y puede contener parcialmente una modificación en la secuencia base de ARNnp natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp y/o pueda ser una secuencia parcial de ARNnp U7 natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 utilizada en la presente invención es una región compuesta por una secuencia parcial de la secuencia base de ARNnp U7. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 utilizada en la presente invención es una región compuesta por una secuencia parcial de la secuencia base de ARNnp U7 y, en algunas modalidades, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 que contiene un sitio de unión a proteína Sm (secuencia Sm OPT) y la secuencia de asa en horquilla de ARNnp U7. En el ARN guía de la presente invención, la región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 se puede utilizar mediante la unión de la región antisentido a la secuencia de ARNnp U7, o se puede utilizar mediante la inserción de la región antisentido en la secuencia de ARNnp U7 siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNnp. La región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 1 o una secuencia base, en la que 1 a 10 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 4, y que tiene la función de la secuencia de ARNnp.

En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNr. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNr y una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla.

La región compuesta por una secuencia de ARNr utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base de un ARNr bien conocida por los expertos en la técnica, y puede contener parcialmente una modificación en la secuencia base de ARNr natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNr. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNr eucariota. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNr 28S, una secuencia de ARNr 18S, una secuencia de ARNr 5.8S, una secuencia de ARNr 5S, una secuencia de ARNr 12S mitocondrial o una secuencia de ARNr 16S mitocondrial o cualquier combinación de estas. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNr 5S.

La región compuesta por una secuencia de ARNr 5S utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base de ARNr 5S y puede contener parcialmente una modificación en la secuencia base de ARNr 5S natural siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNr. En el ARN guía de la presente invención, la región compuesta por una secuencia de ARNr 5S se puede utilizar en combinación con una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial siempre y cuando tenga la función de la secuencia de ARNr. Cuando se utiliza la región compuesta por una secuencia de ARNr 5S y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial, la región antisentido se inserta entre la región compuesta por una secuencia de ARNr 5S y la región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de ARNr 5S utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 5 o una secuencia base, en la que 1 a 10 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 5, y que tiene la función de la secuencia de ARNr. En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial utilizada en la presente invención es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2, y que forma una estructura de asa en horquilla.

En algunas realizaciones, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de bases para formar una estructura cuádruple de guanina, una región compuesta por una secuencia de bases para formar una estructura de asa en horquilla, o una combinación del mismo. En algunas realizaciones, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de bases para formar una estructura cuádruple de guanina. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla.

La región compuesta por una secuencia de bases para formar una estructura cuádruple de guanina (estructura Gq) utilizada en la presente invención contiene una secuencia Gq. La secuencia Gq es una secuencia que contiene cuatro unidades de repetición compuestas por bases de guanina consecutivas, y cuatro bases de guanina forman una estructura cuádruplex (Gq) en un plano. Una base que no sea guanina puede estar contenida entre las unidades de repetición compuestas por guanina siempre y cuando la estructura Gq se mantenga. En algunas modalidades, la secuencia de Gq contiene 1, 2, 3 o 4 unidades de repetición compuestas por bases de guanina consecutivas y forma Gq de 1, 2, 3 o 4 capas, respectivamente. En algunas modalidades, la secuencia Gq contiene 3 unidades de repetición compuestas por bases de guanina consecutivas y forma Gq de 3 capas. Esto se denomina "estructura cuádruplex de guanina de 3 capas" (en lo sucesivo, también denominada "3Gq"). En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia base para formar 3Gq, y en algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia base para formar 3Gq es una región

compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 6 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 6, y que forma una estructura Gq.

La estructura de asa en horquilla también se denomina estructura de horquilla y es bien conocida en el campo técnico. Los ejemplos de la secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla incluyen una secuencia aptámero (Int. J. Biochem. Mol. Biol., 2013, Vol. 4, pp. 27-40, WO 2016/143700), una secuencia derivada de secuencia BoxB, una secuencia derivada de secuencia MS2, una secuencia derivada de secuencia PP7 (Integr. Biol., 2009, Vol. 1, pp. 499-505, Nuclear Acids Research, 2016, Vol. 44, pp. 9555-9564), una secuencia de asa en horquilla artificial (por ejemplo, una secuencia de asa en horquilla (secuencia STL) contenida en un casete U6 o un casete 5S) (Gene Ther., 1997, Vol. 4, pp. 45-54, Nat. Biotechnol., 2002, Vol. 20, pp. 505-508, Mol. Ther., 2003, Vol. 7, pp. 237-247)), y lo similar.

En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, y la región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla es una secuencia derivada de secuencia BoxB, una secuencia aptámero, una secuencia derivada de secuencia MS2, una secuencia derivada de secuencia PP7, una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial (por ejemplo, una secuencia STL) o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia derivada de secuencia BoxB. En algunas realizaciones, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia STL.

En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia derivada de la secuencia BoxB utilizada en la presente invención está compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 7 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 7, y que forma una estructura de asa en horquilla.

En algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial utilizada en la presente invención es una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial (secuencia STL) contenida en un casete U6 o un casete 5S, y en algunas modalidades, una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2, y que forma una estructura de asa en horquilla.

En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARN derivada de SRP, y en algunas modalidades, la región compuesta por una secuencia de ARN derivada de SRP es una región compuesta por una secuencia de ARN 7SL, una secuencia de ARN 6S o una secuencia de ARN 4.5S.

En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención puede contener al menos dos

regiones funcionales idénticas y, en otras modalidades, al menos una de cada una de dos o más regiones funcionales diferentes.

4. Vinculación de regiones funcionales

En el ARN guía de la presente invención, la región funcional se une a la región antisentido. El "enlace", tal como se usa en la presente, incluye unión directa y unión mediante un enlazador. En algunas modalidades, en el ARN guía de la presente invención, al menos una región funcional está directamente unida a la región antisentido. En otras modalidades, en el ARN guía de la presente invención, al menos una región funcional está unida a la región antisentido mediante un enlazador. Cuando se unen múltiples regiones funcionales y se utilizan en el ARN guía de la presente invención, la unión entre las regiones funcionales puede ser unión directa o unión a través de un enlazador.

Cuando se utiliza un enlazador, en algunas modalidades, la longitud del enlazador es de 1 a 10 bases, en algunas modalidades, de 1 a 6 bases, en algunas modalidades, de 1 a 3 bases, en algunas modalidades, de 3 a 6 bases, en algunas modalidades, 3 bases, y en algunas modalidades, 6 bases. La secuencia de bases del enlazador puede ser diseñada apropiadamente por los expertos en la técnica basándose en la secuencia que constituye el ARN guía. Por ejemplo, la secuencia base del enlazador utilizado en la presente invención se puede diseñar para no formar una cadena complementaria con el ARN blanco. En algunas modalidades, el enlazador está compuesto por una secuencia base "UCU", "GUCGAC" que es una secuencia de sitio SalI de enzima de restricción, o "UCUAGA" que es una secuencia de sitio XbaI de enzima de restricción.

En algunas modalidades, cuando el ARN guía de la presente invención contiene, a manera de la región funcional, una región compuesta por una secuencia derivada de secuencia BoxB, se puede utilizar el enlace a través de un enlazador entre la región compuesta por una secuencia derivada de secuencia BoxB y la región antisentido y entre la región compuesta por una secuencia derivada de secuencia BoxB y otra región funcional, y en algunas modalidades, el enlazador es una secuencia base "UCU". En algunas modalidades, cuando el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, o cuando el ARN guía de la presente invención contiene, como región funcional, una región compuesta por una secuencia de ARNr 5S y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, la región antisentido puede estar unida a la región funcional a través de un enlazador y, en algunos casos, el enlazador es una secuencia base "GUCGAC" o "UCUAGA".

5. ARN guía para editar el ARN blanco

El ARN guía de la presente invención es un ARN guía que no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR. La "secuencia base de reclutamiento de ADAR" es una secuencia base en la que se forma una estructura de asa en horquilla en la misma molécula, y ADAR se une a la estructura de asa en horquilla para que el ADAR se pueda reclutar a un ARN blanco. Como ejemplo de

la secuencia base de reclutamiento de ADAR, se ejemplifica una secuencia base diseñada en función de una estructura de bucle de vástago derivada de un sustrato ADAR tal como un precursor de ARNm de GluR2 (WO 2016/097212, WO 2017/050306, patente alemana Núm. 102015012522, WO 2017/010556, WO 2019/111957, Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, pp. 2797-2808, Nature Methods, 2019, Vol. 16, pp. 239-242). En la presente invención, la frase "no contiene sustancialmente" una secuencia de bases de reclutamiento de ADAR significa que una secuencia de bases de reclutamiento de ADAR no está contenida en la misma molécula del ARN guía.

En algunas realizaciones, el ARN guía de la presente invención es cualquiera de los siguientes ARN guía:

un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está directamente unida a la región antisentido y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR, o

un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido mediante un enlazador y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR.

En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención es el siguiente ARN guía:

un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido, en donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR y donde la región antisentido tiene una base para formar un par de bases que no coincide con el ARN blanco.

En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención es un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido, en donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR y el ARN guía tiene la siguiente característica:

(1) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base que tiene una o más funciones entre funciones que incluyen estabilización del ARN guía, localización del ARN guía al núcleo, localización del ARN guía al citoplasma, promoción de la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido, inhibición de la formación de cadena doble no específica por la región antisentido y estabilización de un complejo formado a partir del ARN blanco y la región antisentido,

(2) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp, una región compuesta por una secuencia de ARNr, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura

cuádruplex de guanina o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla o cualquier combinación de las mismas,

(3) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(4) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp que se selecciona a partir de una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 y una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(5) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6 y una región compuesta por una secuencia de bucle de tallo artificial,

(6) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base, que es una secuencia parcial de la secuencia base de una secuencia de ARNnp U6 y tiene la función de la secuencia de ARNnp, y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial,

(7) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base, que es una secuencia parcial del sitio de inicio de la transcripción a la posición 27 de la secuencia base de una secuencia de ARNnp U6 y tiene la función de la secuencia de ARNnp, y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial,

(8) la región funcional es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 1 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 1, y que tiene la función de la secuencia de ARNnp, y una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2, y que forma una estructura de asa en horquilla,

(9) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1,

(10) la región funcional es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 3 o una secuencia base, en la que 1 a 20 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 3, y que tiene la función de la secuencia de ARNnp,

(11) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base, en la que 8 bases de la posición 3 a la posición 10 del sitio de inicio de la transcripción se han eliminado en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 3, y que tiene la función de la secuencia de ARNnp,

(12) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7,

(13) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base, que es una secuencia parcial de la secuencia base de ARNnp U7 que contiene un sitio de unión a proteína Sm (secuencia Sm OPT) y la secuencia de bucle madre de ARNnp U7, y tiene la función de la secuencia de ARNnp,

(14) la región funcional es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID

NO: 4 o una secuencia base, en la que 1 a 10 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 4, y que tiene la función de la secuencia de ARNnp,

(15) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNr y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(16) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNr 5S y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(17) la región funcional es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 5 o una secuencia base, en la que 1 a 10 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 5, y que tiene la función de una secuencia de ARNr, y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(18) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNr 5S y una región compuesta por una secuencia de bucle de tallo artificial,

(19) la región funcional es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 5 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 5, y que tiene la función de la secuencia de ARNr, y una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 2, y que forma una estructura de asa en horquilla,

(20) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, o una combinación de las mismas,

(21) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina,

(22) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina de 3 capas,

(23) la región funcional es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 6 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 6, y que forma una estructura cuádruplex de guanina,

(24) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(25) la región funcional es una región compuesta por una secuencia derivada de secuencia BoxB,

(26) la región funcional es una región compuesta por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 7 o una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 7, y que forma una estructura de asa en horquilla,

(27) la región funcional es una combinación de una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina y una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, o

(28) la región funcional es una combinación de una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina de 3 capas y una región compuesta por una secuencia derivada de secuencia BoxB.

En el ARN guía de la presente invención que tiene cualquiera de las características (1) a (28) mencionadas anteriormente, la al menos una región funcional puede estar directamente unida a la región antisentido o unida a esta a través de un enlazador.

En algunas modalidades, el ARN guía de la presente invención es un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido, en donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR y el ARN guía tiene la siguiente característica:

(a-1) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia de ARNnp U6, una región antisentido, un enlazador opcionalmente contenido y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial, y la región funcional compuesta por una secuencia de ARNnp U6, la región antisentido y la región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-2) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base, que es una secuencia parcial desde el sitio de inicio de la transcripción hasta la posición 27 de la secuencia base de una secuencia de ARNnp U6 y tiene la función de la secuencia de ARNnp, una región antisentido, un enlazador opcionalmente contenido y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial y la región funcional compuesta por una secuencia base, que es una secuencia parcial desde el sitio de inicio de la transcripción hasta la posición 27 de la secuencia base de una secuencia de ARNnp U6 y tiene la función de la secuencia de ARNnp, la región antisentido y la región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-3) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia de ARNnp U1 y una región antisentido, y la región antisentido está insertada en la secuencia base de la secuencia de ARNnp U1,

(a-4) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base en la que 8 bases de la posición 3 a la posición 10 del sitio de inicio de la transcripción de la secuencia base de una secuencia de ARNnp U1 se han eliminado, y que tiene la función de la secuencia de ARNnp, y una región antisentido, y la región antisentido se inserta en la posición 3 del sitio de inicio de la transcripción de la secuencia base de la secuencia de ARNnp U1,

(a-5) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia de ARNnp U7 y una región antisentido, y la región antisentido y la región funcional compuesta por una secuencia de ARNnp U7 están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-6) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base, que es una secuencia parcial de la secuencia base de una secuencia de ARNnp U7 que contiene un sitio de unión a proteína Sm (secuencia Sm OPT) y la secuencia de asa en horquilla de ARNnp U7, y tiene la función de la secuencia de ARNnp, y una región antisentido, y la región antisentido y la región funcional compuesta por una secuencia parcial de la secuencia base de la secuencia de ARNnp U7 están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-7) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia de ARNr 5S, una región antisentido, un enlazador opcionalmente contenido y una región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial, y la región funcional compuesta por una secuencia de ARNr 5S, la región antisentido y la región compuesta por una secuencia de asa en horquilla artificial están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-8) el ARN guía está compuesto por una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina y un enlazador opcionalmente contenido, y la región antisentido y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-9) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región antisentido y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina y la región antisentido están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(-10) el ARN guía está compuesto por una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región funcional adicional y un enlazador opcionalmente contenido, y la región antisentido, la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina y la región funcional adicional están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3', o

(-11) el ARN guía está compuesto por una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región funcional adicional y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional adicional, la región antisentido, la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3', o

(a-12) el ARN guía está compuesto por una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de asa en horquilla, un enlazador opcionalmente contenido, y la región antisentido y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una

estructura cuádruplex de asa en horquilla están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-13) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla, una región antisentido y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una asa en horquilla y la región antisentido están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-14) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, una región antisentido, una región funcional adicional y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, la región antisentido y la región funcional adicional están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-15) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, la región antisentido y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-16) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, la región antisentido y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

(a-17) el ARN guía está compuesto por una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla y un enlazador opcionalmente contenido, la región antisentido y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3', o

(a-18) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla, una región antisentido y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla y la región antisentido están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3',

ADAR utilizado en la presente invención

El ADAR utilizado en la presente invención también incluye ADAR de origen natural y variantes de este siempre que tengan actividad desaminasa. La actividad de desaminasa se puede medir mediante la detección de la desaminación de un sustrato mediante un método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la actividad de la desaminasa se puede medir mediante la detección de la conversión de adenosina en inosina o la conversión de citidina en uridina. Específicamente, la actividad desaminasa puede medirse mediante el método descrito en el Ejemplo 7 u 8. El ADAR utilizado en la presente invención es, en algunas modalidades, ADAR derivado de EUCARIOTAS, en algunas modalidades, ADAR derivado de mamíferos y, en algunas modalidades, ADAR humano. El ADAR utilizado en la presente invención es, en algunas modalidades, ADAR1 o ADAR2, y en algunas modalidades, ADAR2. ADAR1 incluye dos variantes de empalme ADAR1 p110 y ADAR1 p150, y el ADAR utilizado en la presente invención es, en algunas modalidades, ADAR1 p110 o ADAR1 p150. El ADAR utilizado en la presente invención es, en algunas modalidades, ADAR1 humano o ADAR2 humano y, en algunas modalidades, ADAR2 humano. El ADAR utilizado en la presente invención es, en algunas modalidades, un polipéptido que contiene un dominio de unión al ARN de cadena doble (DUAbc) y que tiene actividad enzimática desaminasa (Trends in Biochemical Sciences, 2001, Vol. 26, pp. 376-384, RNA, 2001, Vol. 7, pp. 846-858). El ADAR utilizado en la presente invención es, en algunas modalidades, un polipéptido que contiene un dominio de desaminasa y puede convertir la adenosina del ARN blanco en inosina. El ADAR utilizado en la presente invención es, en otras modalidades, un polipéptido que contiene un dominio desaminasa y puede convertir citidina del ARN blanco en uridina. El ADAR utilizado en la presente invención es, en incluso otras modalidades, un polipéptido que contiene un dominio desaminasa y puede convertir la adenosina del ARN blanco en inosina y la citidina de este en uridina. El ADAR utilizado en la presente invención puede ser una proteína de fusión con otro factor. La variante de ADAR utilizada en la presente invención incluye una variante que tiene actividad de adenosina desaminasa, una variante que tiene actividad de citidina desaminasa, y una variante que reconoce tanto adenosina como citidina y tiene actividad desaminasa para convertir adenosina y citidina en inosina y uridina, respectivamente (Science, 2019, Vol. 365, pp. 382-386). El ADAR y las variantes de ADAR utilizadas en la presente invención pueden ser proteínas de fusión con otro factor.

En algunas modalidades, el ADAR utilizado en la presente invención es un polipéptido compuesto por la secuencia de aminoácidos expuesta en el Núm. de acceso [NP_001103.1], Núm. de acceso [NP_056648.1], o Núm. de acceso [NP_001102.3], o un polipéptido que está compuesto por una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más de identidad con cualquiera de estas secuencias de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos, en la que 1 a 10 aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en cualquiera de estas secuencias de aminoácidos, y que tiene actividad de adenosina desaminasa. El ADAR utilizado en la presente invención es, en algunas modalidades, un polipéptido compuesto por la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9 (ADAR2 humano) o un polipéptido que está compuesto por una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más de identidad con la secuencia o una secuencia de

aminoácidos, en la que 1 a 10 aminoácidos se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia, y que tiene actividad de adenosina desaminasa. El ADAR utilizado en la presente invención, en algunas modalidades, está presente de forma endógena en una célula eucariota y, en algunas modalidades, puede introducirse de forma exógena en una célula eucariota. La introducción de ADAR en una célula eucariota se puede llevar a cabo introduciendo directamente un polipéptido de ADAR, o introduciendo un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para ADAR.

La "identidad", tal como se usa en la presente, significa un valor (Identidad) obtenido mediante el uso de parámetros proporcionados por defecto mediante la búsqueda mediante el uso del programa informático (J. Mol. Biol., 1970, Vol. 48, pp. 443-453). Los parámetros son los siguientes.

Penalización por hueco abierto = 10

Penalización por ampliación de hueco = 0.5

Matriz = EBLOSUM62

Sistema para editar el ARN blanco de la presente invención

La presente invención también proporciona un sistema para editar un ARN blanco que incluye el ARN guía de la presente invención y ADAR. El sistema para editar una secuencia de ARN blanco que incluye el ARN guía de la presente invención y ADAR incluye un kit para editar una secuencia de ARN blanco que incluye el ARN guía de la presente invención y ADAR, o un método para editar una secuencia de ARN blanco usando el ARN guía de la presente invención y ADAR. En algunas modalidades, el sistema para editar un ARN blanco de la presente invención es un sistema que incluye un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR y el sistema incluye ADAR y, en algunas modalidades, un sistema que incluye un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR y el sistema incluye ADAR1 o ADAR2.

El sistema para editar un ARN blanco de la presente invención se puede utilizar tanto intracelular como extracelularmente. En algunas modalidades, el sistema se puede utilizar en una célula eucariota. En algunas realizaciones, el sistema puede usarse en una célula procariota, en una bacteria, en un fago, en un virus o similar.

Guía de codificación de ácido nucleico ARN de la presente invención

La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención (también denominado "el ácido nucleico de la presente invención" en esta sección). El ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico que codifica un ARN guía que contiene al

menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR. En algunas modalidades, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico que codifica un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido, en donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR y donde un ácido nucleico que codifica la región funcional incluye los siguientes ácidos nucleicos:

(1) un ácido nucleico compuesto por una secuencia base representada por una SEQ ID NO que se selecciona de SEQ ID nos que se muestra en la siguiente "Región funcional que codifica para ácidos nucleicos",

(2) un ácido nucleico compuesto por una secuencia base, en la que 1 a 20 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 12 que se muestra en la siguiente "Región funcional que codifica para ácidos nucleicos", y que tiene una función a manera de la región funcional,

(3) un ácido nucleico compuesto por una secuencia base, en la que 1 a 10 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 13 o 14 que se muestra en la siguiente "Región funcional que codifica para ácidos nucleicos", y que tiene una función a manera de la región funcional,

(4) un ácido nucleico compuesto por una secuencia base, en la que 1 a 3 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia base representada por SEQ ID NO: 10, 11, 15 o 16 que se muestra en la siguiente "Región funcional que codifica para ácidos nucleicos", y que codifica una región que tiene una función a manera de la región funcional, o

(5) algunas combinaciones de ácidos nucleicos incluidas en (1) a (3):

Ácidos nucleicos que codifican para la región funcional

Ácido nucleico que codifica para ARNnp U6: SEQ ID NO: 10

Ácido nucleico que codifica para STL: SEQ ID NO: 11

Ácido nucleico que codifica para ARNnp U1: SEQ ID NO: 12

Ácido nucleico que codifica para ARNnp U7: SEQ ID NO: 13

Ácido nucleico que codifica para ARNr 5S: SEQ ID NO: 14

Ácido nucleico que codifica para 3Gq: SEQ ID NO: 15

Ácido nucleico que codifica para BoxB: SEQ ID NO: 16

El ácido nucleico de la presente invención tiene una estructura en la que se enlaza un ácido desoxirribonucleico y, por ejemplo, es un ADN y, en algunas modalidades, es un ADN. En algunas

modalidades, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico integrado en un vector de expresión. En algunas modalidades, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico integrado en un vector de plásmido. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico integrado en un vector de virus.

Una modalidad específica del ARN guía codificado por el ácido nucleico de la presente invención es la misma que la modalidad del ARN guía de la presente invención descrita en la sección anterior ARN guía de la presente invención. A continuación, se muestran ejemplos específicos. En algunas modalidades, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico que codifica cualquiera de los siguientes ARN guía:

un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está directamente unida a la región antisentido y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR,

un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido mediante un enlazador y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR, o

un ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido, en donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR y donde la región antisentido tiene una base para formar un par de bases que no coincide con el ARN blanco.

En algunas modalidades, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico que codifica para ARN guía que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido, en donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR y en donde el ARN guía tiene la siguiente característica:

(1) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base que tiene una o más funciones entre funciones que incluyen estabilización del ARN guía, localización del ARN guía al núcleo, localización del ARN guía al citoplasma, promoción de la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido, inhibición de la formación de cadena doble no específica por la región antisentido y estabilización de un complejo formado a partir del ARN blanco y la región antisentido,

(2) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp, una región compuesta por una secuencia de ARNr, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura

cuádruplex de guanina o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla o cualquier combinación de las mismas,

(3) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(4) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp que se selecciona a partir de una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 y una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(5) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNr y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(6) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNr 5S y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(7) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, o una combinación de las mismas,

(8) el ARN guía está compuesto por una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región funcional adicional opcionalmente contenida y un enlazador opcionalmente contenido, y la región antisentido, la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina y la región funcional adicional opcionalmente contenida están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3', o

(9) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, una región antisentido, una región funcional adicional opcionalmente contenida y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla y la región antisentido están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3'.

Ácido nucleico que codifica EL ADAR utilizado en la presente invención

El ácido nucleico que codifica ADAR utilizado en la presente invención es un ácido nucleico que codifica ADAR descrito en el ADAR anterior utilizado en la presente invención. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica para ADAR utilizado en la presente invención es un ácido nucleico compuesto por una secuencia base que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en el Núm. de acceso [NP_001103.1], Núm. de acceso [NP_056648.1], o Núm. de acceso [NP_001102.3], o un ácido nucleico que está compuesto por una secuencia base que tiene 90% o más de identidad con al menos una de estas secuencias o una secuencia base, en la que 1 a 10 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en al menos una de estas secuencias, y que codifica un polipéptido que tiene actividad de adenosina desaminasa. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica ADAR utilizado en la presente

invención es un ácido nucleico compuesto por la secuencia base representada por SEQ ID NO: 8, o un ácido nucleico que está compuesto por una secuencia base que tiene 90% o más de identidad con la secuencia o una secuencia base, en la que 1 a 10 bases se han eliminado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia, y que codifica un polipéptido que tiene actividad de adenosina desaminasa.

Vector de expresión que contiene el ARN guía de codificación de ácido nucleico de la presente invención

La presente invención también proporciona un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención (también denominado "el vector de expresión de la presente invención"). La presente invención también proporciona un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de la presente invención y un ácido nucleico que codifica para ADAR. El ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención y el ácido nucleico que codifica ADAR pueden clonarse en el mismo vector de expresión o en diferentes vectores de expresión. En algunas realizaciones, el vector de expresión de la presente invención es una combinación de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención y un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica ADAR. En algunas modalidades, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de la presente invención y un ácido nucleico que codifica para ADAR.

1. Vector de expresión utilizado en la presente invención

El vector de expresión utilizado en la presente invención no se limita siempre que sea un vector de expresión capaz de expresar el ARN guía de la presente invención a partir de un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención y/o un vector de expresión capaz de expresar ADAR. En algunas modalidades, el vector de expresión utilizado en la presente invención es un vector de expresión que se puede utilizar para expresar el ARN guía de la presente invención y/o para expresar ADAR en una célula humana. En algunas modalidades, los ejemplos del vector de expresión utilizado en la presente invención incluyen un vector de plásmido, un vector de virus (por ejemplo, un vector de adenovirus, un vector de retrovirus y un vector de virus adenoasociado) y similares.

2. Promotor

El vector de expresión de la presente invención puede contener un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención y/o un ácido nucleico que codifica ADAR. La frase "unido funcionalmente", tal como se usa en la presente, significa que al menos un promotor está unido a un ácido nucleico de modo que un polipéptido o un ARN codificado por el ácido nucleico pueda expresarse en una célula hospedera. El promotor contenido en el vector de expresión de la presente invención no está limitado, pero se puede utilizar un promotor correspondiente a una ARN polimerasa (por ejemplo, ARN polimerasa II (polII) o ARN polimerasa III (polIII)) adecuado para expresar el ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención o ADAR. Para expresar el ARN guía de la presente

invención, en algunas realizaciones se puede utilizar un promotor correspondiente a polII o polIII y en otras realizaciones se puede utilizar un promotor correspondiente a polIII. Con el fin de expresar ADAR, en algunas modalidades, se puede utilizar un promotor correspondiente a polII.

Los ejemplos del promotor correspondiente a polII incluyen un promotor derivado de CMV (citomegalovirus), un promotor de SV40 (virus de simio 40), un promotor de RSV (virus sincitial respiratorio), un promotor de EF-1α (factor de alargamiento 1α), un promotor de CAG, un promotor de ARNnp U1, un promotor de ARNnp U7 y similares. Los ejemplos del promotor correspondiente a polIII incluyen un promotor de ARNnp de U6 humano (U6) (Nat. Biotechnol., 2002, vol. 20, págs. 497-500), un promotor de U6 de alta sensibilidad (Nucleic Acids Research, 2003, vol. 31, p. e100), un promotor de H1 humano, un promotor de ARNr 5S y, además, otros promotores de células virales y eucariotas conocidos por los expertos en la materia, entre otros.

El vector de expresión de la presente invención puede contener además un codón de inicio de traducción, un codón de terminación de traducción, una base de purina (G o A) preferible para el sitio de inicio de transcripción de polIII, una señal de poliA, una secuencia terminadora compuesta de T consecutiva para polIII, un potenciador, una región no traducida, una unión de empalme o similar.

Célula hospedera de la presente invención

La presente invención también proporciona una célula hospedera transformada mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención (también denominado "la célula hospedera de la presente invención"). En algunas modalidades, la célula hospedera de la presente invención es una célula hospedera en la que se ha introducido el vector de expresión de la presente invención. En algunas modalidades, la célula hospedera de la presente invención es una célula hospedera en la que se ha introducido el vector de expresión de la presente invención, que es un vector de plásmido. En algunas realizaciones, la célula hospedera de la presente invención es una célula hospedera en la que se ha introducido un vector de plásmido para producir el vector de expresión de la presente invención, que es un vector de virus. En algunas modalidades, la célula hospedera de la presente invención es una célula hospedera en la que se ha introducido el vector de expresión de la presente invención, que es un vector de virus.

La célula hospedera en la que se introduce el vector de expresión de la presente invención no está limitada, pero se puede seleccionar una célula conocida en la técnica siempre que sea una célula que se pueda utilizar en la producción de un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención o el vector de expresión de la presente invención. Los ejemplos de la célula hospedera que se pueden utilizar para la replicación del vector incluyen varias células tales como células naturales comúnmente utilizadas en el campo técnico de la presente invención o células establecidas artificialmente. Los ejemplos de la célula hospedera que se pueden utilizar para la replicación del vector incluyen células animales (por ejemplo, células CHO, células HEK 293, etc.), células de insecto (por ejemplo, Sf9, etc.), bacterias (E. coli, etc.),

levadura (género Saccharomyces, género Pichia, etc.) y similares). En algunas modalidades, E. coli se puede utilizar como la célula hospedera. La transformación se puede llevar a cabo mediante un método conocido por los expertos en la materia (Green, M. R. y Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012).

Métodos para producir el ARN guía que codifica el ácido nucleico de la presente invención y el vector de expresión de la presente invención

El ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención (también denominado "el ácido nucleico de la presente invención" en esta sección) se puede sintetizar usando un método estándar de síntesis de polinucleótidos conocido en la técnica basado en la secuencia descrita en este documento o públicamente información de secuencia disponible. Además, si se obtiene un determinado ácido nucleico de la presente invención, mediante la introducción de una mutación en un sitio predeterminado utilizando un método conocido por los expertos en la materia tal como un método de mutagénesis dirigido al sitio (Current Protocols in Molecular Biology edition, 1987, John Wiley & Sons Section), también se puede producir otro ácido nucleico de la presente invención.

Los métodos para producir el ácido nucleico de la presente invención y el vector de expresión de la presente invención incluyen un método para producir un ácido nucleico que incluye una etapa de cultivo de una célula hospedera en la que se encuentra el ácido nucleico de la presente invención o un vector de expresión que contiene el ácido nucleico. se ha introducido el ácido de la presente invención. En algunas modalidades, el método para producir el ácido nucleico de la presente invención incluye una etapa de cultivo de una célula hospedera en la que se ha introducido el ácido nucleico de la presente invención y se ha replicado el ácido nucleico de la presente invención. En algunas modalidades, el método para producir el ácido nucleico de la presente invención incluye una etapa de cultivo de una célula hospedera en la que se ha introducido el vector de expresión que contiene el ácido nucleico de la presente invención y se ha replicado el vector de expresión de la presente invención. Cuando el vector de expresión de la presente invención es un vector de virus, el método para producir el vector de expresión de la presente invención incluye una etapa de cultivo de una célula hospedera en la que se ha introducido un plásmido de vector de virus que contiene el ácido nucleico de la presente invención y purificar el vector de virus producido en la célula hospedera. El vector de virus se puede producir mediante un método conocido por los expertos en la materia.

Los métodos para producir el ácido nucleico de la presente invención y el vector de expresión de la presente invención pueden incluir una etapa de recuperación de una solución de cultivo de la célula hospedera y obtener un lisado (solución bacteriolítica). El lisado se puede obtener, por ejemplo, tratando la solución de cultivo recuperada con un método de disolución alcalina o un método de ebullición. El método para producir el ácido nucleico de la presente invención puede incluir además una etapa de purificación del ácido nucleico o el vector de expresión del lisado. La cromatografía de intercambio iónico y/o la

cromatografía de interacción hidrófoba se pueden utilizar para la purificación del ácido nucleico o el vector de expresión del lisado. Cuando el vector de expresión de la presente invención es un vector de virus, en la purificación del vector de virus a partir del lisado, también se puede utilizar un método de centrifugación de gradiente de densidad de cloruro de cesio, un método de centrifugación de gradiente de sacarosa, un método de centrifugación de gradiente de densidad de yodixanol, un método de ultrafiltración, un método de diafiltración, un método de cromatografía de afinidad, un método de cromatografía de intercambio iónico, un método de precipitación de polietilenglicol, un método de precipitación de sulfato de amonio o lo similar.

Método para producir ARN guía de la presente invención

El ARN guía de la presente invención se puede sintetizar en función de la información de secuencia utilizando un método de síntesis de polinucleótidos convencionales conocidos en la materia. Además, si se obtiene un determinado ARN guía de la presente invención, mediante la introducción de una mutación en un sitio predeterminado utilizando un método conocido por los expertos en la materia tal como un método de mutagénesis dirigido al sitio (Current Protocols in Molecular Biology edition, 1987, John Wiley & Sons Section), también se puede producir una variante del ARN guía de la presente invención que mantiene la función de guía al ARN blanco y la función de edición del ARN blanco. El ARN guía de la presente invención también se puede producir usando un ácido nucleico modificado. El ARN guía de la presente invención también se puede producir usando un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de la presente invención. Por ejemplo, el ARN guía de la presente invención se puede producir transcribiendo el ARN guía de la presente invención a partir de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención.

Polinucleótido de la presente invención

La presente invención también proporciona un polinucleótido para editar un ARN blanco mediante ADAR, que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y donde el polinucleótido no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR (en lo sucesivo, también denominada “el polinucleótido de la presente invención”).

El "polinucleótido" utilizado en la presente incluye un nucleótido no modificado (ADN o ARN) y un nucleótido modificado. Los ejemplos del nucleótido modificado utilizado en la presente invención incluyen un nucleótido en el que se ha modificado un grupo 2'-OH de una ribosa, un nucleótido en el que se ha modificado un enlace fosfodiéster entre nucleósidos, un nucleótido en el que se ha convertido una ribosa, un nucleótido en el que se ha modificado un residuo de purina o un residuo de pirimidina, un nucleótido que contiene una ribosa intramolecularmente reticulada y lo similar. Los ejemplos del nucleótido en el que se ha modificado un grupo 2'-OH de una ribosa incluyen un nucleótido que contiene 2’ -O-metilribosa, 2’-fluororibosa o lo similar. Los ejemplos del nucleótido en el que se ha modificado un enlace

fosfodiéster entre nucleósidos incluyen un nucleótido que contiene fosforotioato, metilfosfonato o similares, o un ácido nucleico unido a péptidos (PNA: ácido nucleico peptídico). El nucleótido en el que se ha convertido una ribosa incluye un ácido nucleico de morfolino (PMO) y lo similar. El nucleótido en el que se ha modificado un residuo de purina o un residuo de pirimidina incluye 5-metil-desoxicitidina-fosfato (5-Me-dCMP), 2-amino-desoxiadenosina-fosfato (2-amino-dAMP) y un nucleótido que contiene pirimidina modificada con C5. El nucleótido que contiene una ribosa intramolecularmente reticulada incluye un ácido nucleico bloqueado (LNA) y similares. El polinucleótido de la presente invención se puede producir mediante un método conocido en la materia basado en la secuencia base que se utilizará y el tipo de modificación.

Una modalidad específica del polinucleótido de la presente invención es la misma que la modalidad del ARN guía de la presente invención descrita en las secciones mencionadas anteriormente ARN guía de la presente invención y ARN guía que codifica ácido nucleico de la presente invención. A continuación, se muestran ejemplos específicos.

En algunas modalidades, el polinucleótido de la presente invención es cualquiera de los siguientes polinucleótidos:

un polinucleótido que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está directamente unida a la región antisentido y donde el polinucleótido no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR,

un polinucleótido que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido mediante un enlazador y donde el polinucleótido no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR, y

un polinucleótido que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido, en donde el polinucleótido no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR y donde la región antisentido tiene una base para formar un par de bases que no coincide con el ARN blanco.

En algunas modalidades, el polinucleótido de la presente invención es un polinucleótido que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una porción del ARN blanco y forma una cadena doble con el ARN blanco, en donde al menos una la región funcional está unida a la región antisentido, en donde el polinucleótido no contiene sustancialmente una secuencia de bases de reclutamiento de ADAR, y en donde el polinucleótido tiene la siguiente característica:

(1) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base que tiene una o más funciones entre funciones que incluyen estabilización de un ARN guía, localización de un ARN guía al

núcleo, localización de un ARN guía al citoplasma, promoción de la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido, inhibición de la formación de cadena doble no específica por la región antisentido y estabilización de un complejo formado a partir del ARN blanco y la región antisentido,

(2) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp, una región compuesta por una secuencia de ARNr, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla o cualquier combinación de las mismas,

(3) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(4) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp que se selecciona a partir de una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 y una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7 y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(5) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNr y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(6) la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNr 5S y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla,

(7) la región funcional es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, o una combinación de las mismas,

(8) el ARN guía está compuesto por una región antisentido, una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región funcional adicional opcionalmente contenida y un enlazador opcionalmente contenido, y la región antisentido, la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina y la región funcional adicional opcionalmente contenida están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3', o

(9) el ARN guía está compuesto por una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, una región antisentido, una región funcional adicional opcionalmente contenida y un enlazador opcionalmente contenido, y la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla y la región antisentido están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3'.

Composición farmacéutica de la presente invención

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene el ARN guía de la presente invención, un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención (también denominado "el ácido nucleico de la presente invención" en esta sección), el vector de expresión de la presente invención, o el polinucleótido de la presente invención, y un excipiente farmacéuticamente

aceptable (también denominado "la composición farmacéutica de la presente invención"). En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene el ARN guía de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene el ARN guía de la presente invención, ADAR y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene el ácido nucleico de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene el ácido nucleico de la presente invención, ADAR y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de la presente invención, y contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de la presente invención y que contiene un ácido nucleico que codifica para ADAR, y contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de la presente invención, un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para ADAR, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene el polinucleótido de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene el polinucleótido de la presente invención, ADAR y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención y que contiene un ácido nucleico que codifica ADAR1 humano o ADAR2 humano, y contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de la presente invención, un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para ADAR1 humano o ADAR2 humano, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de la presente invención y que contiene un ácido nucleico compuesto por una secuencia base que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos

representada por SEQ ID NO: 9 o una secuencia base que codifica un polipéptido compuesto por una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos y que tiene actividad de adenosina desaminasa, y contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de la presente invención, un vector de expresión que contiene un ácido nucleico compuesto por una secuencia base que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9 o una secuencia base que codifica un polipéptido compuesto por una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos y que tiene actividad de adenosina desaminasa, y contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mediante un método comúnmente utilizado mediante el uso de un excipiente comúnmente utilizado en la materia, es decir, un excipiente farmacéutico, un vehículo farmacéutico o similar. Los ejemplos de la forma de dosificación de dicha composición farmacéutica incluyen preparaciones parenterales tales como una inyección y un agente para infusión, que se pueden administrar mediante administración intravenosa, administración subcutánea, administración intradérmica, administración intramuscular o similares. En la formulación, se puede utilizar un excipiente, un vehículo, un aditivo o lo similar de acuerdo con la forma de dosificación dentro de un intervalo farmacéuticamente aceptable.

La dosis del ARN guía de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de expresión de la presente invención, el polinucleótido de la presente invención, el vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica ADAR o ADAR se pueden ajustar adecuadamente de acuerdo con una célula en la que está presente el ARN blanco, la gravedad de los síntomas o la edad de un paciente, la forma de dosificación de la formulación que se va a utilizar o lo similar. Por ejemplo, se puede adoptar la dosis en el intervalo de 0.001 mg/kg a 100 mg/kg.

Una enfermedad que se puede prevenir o tratar con la composición farmacéutica de la presente invención es, en algunas modalidades, una enfermedad hereditaria, en algunas modalidades, cualquier enfermedad en la que la edición de uno o más nucleósidos de adenosina o citidina en el ARN blanco produce un cambio beneficioso, y en algunas modalidades, cualquier enfermedad en la que la conversión de uno o más nucleósidos de adenosina en el ARN blanco en inosina produce un cambio beneficioso. La composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar como un agente preventivo o terapéutico para cualquier enfermedad en la que la edición de uno o más nucleósidos de adenosina o citidina en el ARN blanco produce un cambio beneficioso. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar como un agente preventivo o terapéutico para cualquier enfermedad en la que la conversión de uno o más nucleósidos de adenosina en el ARN blanco en inosina produce un cambio beneficioso.

La presente invención incluye una composición farmacéutica para prevenir o tratar cualquier enfermedad en la que la edición de uno o más nucleósidos de adenosina o citidina en el ARN blanco produce un cambio beneficioso, que contiene el ARN guía de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de expresión de la presente invención o el polinucleótido de la presente invención. Además, la presente invención incluye un método para prevenir o tratar cualquier enfermedad en la que la edición de uno o más nucleósidos de adenosina o citidina en el ARN blanco produce un cambio beneficioso, que incluye una etapa de administración de una cantidad preventivamente eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz del ARN guía de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de expresión de la presente invención o el polinucleótido de la presente invención. Además, la presente invención incluye el ARN guía de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de expresión de la presente invención o el polinucleótido de la presente invención para usarse en la prevención o tratamiento de cualquier enfermedad en la que la edición de uno o más nucleósidos de adenosina o citidina en el ARN blanco produce un cambio beneficioso. Además, la presente invención incluye el uso del ARN guía de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de expresión de la presente invención o el polinucleótido de la presente invención en la producción de una composición farmacéutica para prevenir o tratar cualquier enfermedad en la que la edición de uno o más nucleósidos de adenosina o citidina en el ARN blanco produce un cambio beneficioso.

Método para editar el ARN blanco de la presente invención

La presente invención también proporciona un método para editar un ARN blanco usando el ARN guía de la presente invención (también denominado "el método de edición de la presente invención"). En algunas realizaciones, el método de edición de la presente invención incluye un método en el que la región antisentido del ARN guía de la presente invención forma una cadena doble con el ARN blanco, ADAR se recluta en el ARN de doble cadena formado y el ARN reclutado ADAR convierte la adenosina de la secuencia de ARN blanco en inosina. Aquí, la adenosina en el ARN blanco que se convertirá en inosina puede formar un par de bases no emparejadas con la región antisentido. En algunas modalidades, el método de edición de la presente invención incluye un método en el que la región antisentido del ARN guía de la presente invención forma una cadena doble con el ARN blanco, ADAR se recluta para el ARN de cadena doble formado y ADAR recluta convierte citidina de la secuencia de ARN blanco en uridina. Aquí, la citidina en el ARN blanco que se convertirá en uridina puede formar un par de bases no emparejadas con la región antisentido.

El método de edición de la presente invención incluye (i) una etapa de introducción del ARN guía de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención, el vector de expresión de la presente invención o el polinucleótido de la presente invención en una célula, un virus o lo similar que tiene un ARN blanco. En algunas modalidades, el método de edición de la presente invención incluye además (ii) una etapa de introducción de ADAR, un ácido nucleico que codifica para ADAR, o un

vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para ADAR en la célula. Las etapas (i) y (ii) se pueden realizar de forma simultánea o separada. En algunas modalidades, la célula blanco de introducción es una célula eucariota, un procariota o similares, y en algunas modalidades, la célula es una célula de mamífero, una bacteria o similares. En algunas realizaciones, el virus blanco de introducción incluye un fago. En algunas modalidades, la adenosina del ARN blanco se convierte en inosina y, en otras modalidades, la citidina del ARN blanco se convierte en uridina. Además, si el ARN blanco se encuentra en una región codificante, el método puede incluir una etapa de lectura de inosina como guanosina durante la traducción.

EJEMPLOS

A menos que se especifique otra cosa, las etapas descritas en los siguientes Ejemplos se pueden llevar a cabo de acuerdo con un método conocido. Además, para las piezas que utilizan un kit o reactivo comercialmente disponible, o o lo similar, se realizó un experimento de acuerdo con el protocolo adjunto a menos que se especifique otra cosa.

Ejemplo 1: Producción de plásmido de expresión para ARN guía con secuencia de ARNnp U6 añadida como región funcional

Un vector en el que un promotor de ARN polimerasa III de H1 (en lo sucesivo denominado promotor H1) de un vector pSUPER.neo (Oligoengine, Inc., Catálogo No. VEC-PBS-0004) se sustituyó con una secuencia promotora de ARNnp polimerasa III (hU6) de U6 humano (SEQ ID NO: 17) (en lo sucesivo denominada vector pSUPER.neo-U6). Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia promotora de hU6 mediante un método de PCR estándar para agregar un sitio de enzima de restricción de EcoRI al lado 5' y un sitio de enzima de restricción de BglII al lado 3' usando un ADN neo de pBAsi-hU6 que tiene un promotor de hU6 (Takara Bio Inc., Catálogo No. 3227) como plantilla. En la reacción, una ADN polimerasa Gflex (Takara Bio Inc., Catálogo No. R060A). El fragmento promotor hU6 obtenido se insertó en el vector pSUPER.neo utilizando el sitio EcoRI de enzima de restricción (lado 5') y el sitio BglII (lado 3'). Las células competentes de E. coli DH5α (Takara Bio Inc., Catálogo No. 9057, en lo sucesivo denominada “cepa de DH5α de E. coli”) se transformaron con el vector de pSUPER.neo-U6 construido y se sometieron a cultivo líquido. La solución de cultivo se centrifugó para recuperar las células bacterianas y la extracción y purificación de plásmidos se realizaron usando NucleoBond (marca registrada) Xtra Midi Plus EF (Takara Bio Inc., Catálogo No. U0422B) y se obtuvo el vector pSUPER.neo-U6 amplificado.

Se construyó un plásmido de expresión para un ARN guía con una secuencia de ARNnp U6 (en lo sucesivo, a veces denominado “U6”) agregada como una región funcional de la siguiente manera. Se insertó una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 18) que codifica un ARN guía U6-ASR-STL corriente abajo del promotor hU6 del vector pSUPER.neo-U6 utilizando el sitio BglII de enzima de restricción (lado 5') y el sitio HindIII (lado 3').

En la producción de la secuencia de ADN a insertar, se utilizó un método de recocido de un oligo

directo y un oligo inverso (a continuación) sintetizado para formar un extremo de escisión de enzima de restricción.

Oligo directo: Secuencia de ADN 5'-GATCT que codifica para el ARN guía-3'

Oligo inverso: Secuencia complementaria inversa a 5'-AGCTT de la secuencia de ADN que codifica para el ARN guía-3'

La secuencia de ADN insertada contiene una base de purina (G o A) preferible para el sitio de inicio de transcripción de polIII en el lado 5' y una secuencia terminadora de polIII en el lado 3'.

El plásmido de expresión de ARN guía producido se denomina pSUPERneo_U6_gARN.

En la presente, ASR representa una secuencia base antisentido compuesta por 24 bases complementarias a una parte de un ARNm indicador de detección (Rluc-W104X) utilizado en el Ejemplo 4, y está compuesta por una secuencia de ARN codificada por una secuencia de la posición 37 a la posición 60 de la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 18. U6 está compuesto por la secuencia de ARN representada por SEQ ID NO: 1, y un ácido nucleico que codifica para U6 está compuesto por la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 10. STL está compuesto por la secuencia de ARN representada por SEQ ID NO: 2, y un ácido nucleico que codifica para STL está compuesto por la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 11.

El resumen del ARN guía se muestra en la Tabla 1. En la Tabla 1, "5'-" indica la región funcional añadida al lado 5' de ASR, y "-3'" indica la región funcional añadida al lado 3' de ASR. "Enlazador" indica una secuencia que enlaza ASR a cada región funcional.

El plásmido de pSUPERneo_U6_gARN diseñado se multiplicó de la misma manera que se describió anteriormente usando una cepa de DH5α de E. coli (Takara Bio Inc., Catálogo No. 9057).

Ejemplo 2: Producción de plásmido de expresión para ARN guía con secuencia de ARNnp U1, secuencia de ARNnp U7 o secuencia de ARNr 5S añadida como región funcional

Se produjo un plásmido de expresión para un ARN guía con una secuencia de ARNnp U1, una secuencia de ARNnp U7 o una secuencia de ARNr 5S (en lo sucesivo, a veces denominada "U1", "U7" y "5S", respectivamente) agregada como una región funcional de la siguiente manera. Se insertó una secuencia promotora correspondiente y una secuencia de ADN que codifica el ARN guía corriente arriba del promotor H1 del vector pSUPER.neo utilizando el sitio EcoRI de enzima de restricción (lado 5') y el sitio HindIII (lado 3'). Una secuencia de ADN que codifica cada uno de los siguientes ARN guía se enlaza inmediatamente corriente abajo de una secuencia promotora de ARNnp de U1 humano (SEQ ID NO: 19), una secuencia promotora de ARNnp de U7 humano (SEQ ID NO: 20), o una secuencia promotora de ARNr 5S (SEQ ID NO: 21).

Nombre del ARN guía y SEQ ID NO del ADN que codifica para el mismo

ASR-U1: SEQ ID NO: 22

ASR-U7: SEQ ID NO: 23

5S-ASR-STL: SEQ ID NO: 24

ASR-U1 y 5S-ASR-STL contienen una secuencia poli-T en el lado 3'.

U1 está compuesto por la secuencia de ARN representada por SEQ ID NO: 3, y un ácido nucleico que codifica para U1 está compuesto por la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 12. ASR-U1 (SEQ ID NO: 22) está compuesto por una secuencia base en la que una secuencia de la posición 3 a la posición 10 de la SEQ ID NO: 12 se ha sustituido con ASR.

U7 está compuesto por la secuencia de ARN representada por SEQ ID NO: 4, y un ácido nucleico que codifica para U7 está compuesto por la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 13.

5S está compuesto por la secuencia de ARN representada por SEQ ID NO: 5, y un ácido nucleico que codifica para 5S está compuesto por la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 14.

El resumen de la secuencia de ADN que codifica cada ARN guía se muestra en la Tabla 1.

Cuando se produjo la secuencia de ADN a insertar, la producción se realizó mediante síntesis de ADN (FASMAC). Los plásmidos obtenidos se denominan pSUPERneo_U1_gARN, pSUPERneo_U7_gARN y pSUPERneo_5S_gARN, respectivamente.

El plásmido diseñado se multiplicó mediante el mismo método que en el Ejemplo 1 usando una cepa de DH5α de E. coli (Takara Bio Inc., Catálogo No. 9057).

Ejemplo 3: Producción de plásmido de expresión para ARN guía con secuencia Gq y/o secuencia derivada de secuencia BoxB agregada como región funcional

Se produjo un plásmido de expresión para un ARN guía con una secuencia Gq (en los ejemplos, la secuencia para formar 3Gq se denomina a veces secuencia Gq) y/o una secuencia derivada de la secuencia BoxB añadida como una región funcional como sigue. Se insertó una secuencia de ADN que codifica para cada uno de 8 tipos de ARN guía (ver Nombre del ARN guía y SEQ ID NO del ADN que codifica para el mismo descrito a continuación) corriente abajo del promotor H1 del vector pSUPER.neo utilizando el sitio BglII de enzima de restricción (lado 5') y el sitio HindIII (lado 3').

Nombre del ARN guía y SEQ ID NO del ADN que codifica para el mismo

ASR-Gq: SEQ ID NO: 25

Gq-ASR: SEQ ID NO: 26

ASR-BoxB: SEQ ID NO: 27

BoxB-ASR: SEQ ID NO: 28

Gq-ASR-BoxB: SEQ ID NO: 29

BoxB-ASR-Gq: SEQ ID NO: 30

ASR-Gq-BoxB: SEQ ID NO: 31

Gq-BoxB-ASR: SEQ ID NO: 32

La secuencia de ADN insertada contiene una base de purina (G o A) preferible para el sitio de inicio de transcripción de polIII en el lado 5' y una secuencia terminadora de polIII en el lado 3'.

Gq está compuesto por la secuencia de ARN representada por SEQ ID NO: 6, y un ácido nucleico que codifica para Gq está compuesto por la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 15. BoxB está compuesto por la secuencia de ARN representada por SEQ ID NO: 7, y un ácido nucleico que codifica para BoxB está compuesto por la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 16. El resumen de cada ARN guía se muestra en la Tabla 1.

La secuencia de ADN a insertar se produjo usando el mismo método que en el Ejemplo 1. Los plásmidos de expresión de ARN guía obtenidos se denominan colectivamente pSUPERneo_H1_gRNA.

El plásmido diseñado se multiplicó mediante el mismo método que en el Ejemplo 1 usando una cepa de DH5α de E. coli (Takara Bio Inc., Catálogo No. 9057).

Un ARN guía para servir a manera de testigo referente se produjo de la misma forma que se describió anteriormente usando una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 33) que no contiene una región funcional y codifica solamente ASR. La secuencia de ADN insertada contiene una base de purina (G o A) preferible para el sitio de inicio de transcripción de polIII en el lado 5' y una secuencia terminadora de polIII en el lado 3'.

Tabla 1

	Región funcional		Nombre del ARN guía	5’-	Enlazador	ASR	Enlazador	-3’
Testigo referente	no		ASR	-	-	ASR(24)	-	-
Ejemplo 1	ARNnp	U6	U6-ASR-STL	U6	GUCGAC		UCUAGA	STL
Ejemplo 2		U1	ASR-U1	AU	-		-	U1
Ejemplo 2		U7	ASR-U7	-	-		-	U7
Ejemplo 2	ARNr	5S	5S-ASR-STL	5S	GUCGAC		UCUAGA	STL
Ejemplo 3	Gq		ASR-Gq	-	-		-	Gq
Ejemplo 3			Gq-ASR	Gq	-		-	-
Ejemplo 3	BoxB		ASR-BoxB	-	-		UCU	BoxB
Ejemplo 3			BoxB-ASR	BoxB	UCU		-	-
Ejemplo 3	Gq/BoxB		Gq-ASR-BoxB	Gq	-		UCU	BoxB
Ejemplo 3			BoxB-ASR-Gq	BoxB	UCU		-	Gq
Ejemplo 3			ASR-Gq-BoxB	-	-		-	Gq-UCU-BoxB

Ejemplo 3		Gq-BoxB-ASR	Gq-BoxB	UCU		-	-

Ejemplo 4: Producción de plásmido de expresión de reportero de detección de actividad de edición de ARN blanco intracelular

Como ARNm indicador para detectar la actividad de edición de ARN blanco intracelular, se utilizó un ARNm de Renilla luciferasa (Rluc). El reportero de detección de actividad de edición de ARN blanco intracelular ARNm Rluc (Rluc-W104X) se diseñó con base en una secuencia de ARNm Rluc codificada por un gen Rluc clonado en un vector psiCHECK-2 (Promega Corporation, Catálogo No. C8021). Específicamente, Rluc-W104X se diseñó de modo que G en la posición 311 de UGG que codifica Trp que es un aminoácido en la posición 104 de Rluc se sustituya con A para codificar un codón de terminación de traducción (UAG) en lugar de Trp. Se produjo un plásmido de expresión Rluc-W104X mediante la sustitución de un vector psiCHECK-2 (Promega Corporation, Catálogo No. C8021) con una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 34) que contiene un sitio de mutación G311A utilizando el sitio DraIII de enzima de restricción (lado 5') y el sitio AatII (lado 3'). El plásmido obtenido se denomina psiCHECK-2_Rluc-W104X. El vector diseñado psiCHECK-2_Rluc-W104X se multiplicó mediante el mismo método que en el Ejemplo 1 usando una cepa de DH5α de E. coli (Takara Bio Inc., Catálogo No. 9057).

Ejemplo 5: Producción de plásmido de expresión ADAR2

Se produjo un plásmido de expresión de ADAR2 mediante la inserción de una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 8) que codifica ADAR2 (SEQ ID NO: 9) en el sitio EcoRI de enzima de restricción (lado 5') y el sitio BamHI (lado 3') corriente abajo de un promotor derivado de CMV de un vector pAAV-CMV (Takara Bio Inc., Catálogo No. 6230) utilizando el sitio EcoRI de enzima de restricción (lado 5') y el sitio BglII (lado 3'). El plásmido obtenido se conoce como pAAV-CMV-ADAR2. En la secuencia de ADN insertada, se colocó una secuencia de Kozak (“ACC” de la posición 13 a la posición 15 de la SEQ ID NO: 8) corriente arriba del codón de inicio de la traducción, y se colocó un codón de terminación aguas abajo del gen ADAR2. El plásmido diseñado pAAV-CMV-ADAR2 se multiplicó mediante el mismo método que en el Ejemplo 1 usando una cepa de DH5α de E. coli (Takara Bio Inc., Catálogo No. 9057).

Ejemplo 6: Transfección:

Experimento 1 (Ensayo de luciferasa cuyos resultados se mostraron en la Tabla 2 y transfección para examinar la eficiencia de edición de ARN mediante secuenciación de Sanger)

Se suspendieron células HEK 293 de la línea celular derivada de riñón embrionario humano en un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Inc., Catálogo No. 10569-010) complementado con 5% de suero fetal de bovino (FBS), y se inocularon en una placa de 96 pocillos a 2.0×10^4 células/100 μL y se cultivaron durante la noche a 37 °C en presencia de 5% de CO_2.

El plásmido de detección de actividad de edición de ARN blanco intracelular (psiCHECK-2_Rluc-W104X) producido en el Ejemplo 4, el plásmido de expresión de ADAR2 (pAAV-CMV-ADAR2)

producido en el Ejemplo 5, el plásmido de expresión de ARN guía (pSUPERneo_U6_gRNA, pSUPERneo_U1_gRNA, pSUPERneo_U7_gRNA, pSUPERneo_5S_gRNA o pSUPERneo_H1_gRNA) producido en el Ejemplo 1, 2 o 3 y un plásmido portador se mezclaron en una proporción en peso de 1:40:30:9 de modo que la cantidad total fue de 100 ng/pocillo. A manera de plásmido portador, se utilizó un vector que aporta pH (Takara Bio Inc., Catálogo No. 6230).

Las células HEK 293 cultivadas durante la noche después de la inoculación se transfectaron usando el reactivo de transfección Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Catálogo No. L3000015). El plásmido de expresión del ARN guía para servir a manera de testigo referente también se transfectó de la misma forma.

Después de la transfección, las células se cultivaron en las mismas condiciones y las células después del cultivo de 3 días se sometieron a un examen de actividad de edición de ARN mediante un ensayo de luciferasa descrito en el Ejemplo 7 y una eficiencia de edición de ARN mediante secuenciación de Sanger descrita en el Ejemplo 8.

Experimento 2 (Ensayo de luciferasa cuyos resultados se mostraron en la Tabla 3 y transfección para examinar la eficiencia de edición de ARN mediante secuenciación de Sanger)

El plásmido de detección de actividad de edición del ARN blanco intracelular (psiCHECK-2_Rluc-W104X), el plásmido de expresión de ADAR2 (pAAV-CMV-ADAR2), el plásmido de expresión de ARN guía (pSUPERneo_U6_gRNA o pSUPERneo_H1_gRNA) producido en el Ejemplo 1 o 3 y un plásmido portador se mezclaron en una proporción en peso de 1:20:15:4 de modo que la cantidad total fue de 100 ng/pocillo y la transfección en células HEK 293 se realizó utilizando el mismo método que en el Experimento 1. A manera de plásmido portador, se utilizó un vector que aporta pH (Takara Bio Inc., Catálogo No. 6230).

Ejemplo 7: Detección de actividad de edición de ARN mediante ensayo de luciferasa

En cada pocillo de células transfectadas en el Ejemplo 6, se midió una intensidad de luminiscencia de luciferasa de luciérnaga (Fluc) para corregir la eficacia de la transfección y una intensidad de luminiscencia de luciferasa de Renilla (Rluc) para evaluar la actividad de edición usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa Dual-Glo (marca registrada) (Promega Corporation, Catálogo No. E2940) y EnVision (PerkinElmer, Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos mediante el experimento de transfección del Experimento 1 del Ejemplo 6.

En la Tabla 2, se calculó un valor de Rluc/Fluc para corregir la eficacia de la transfección entre las muestras, y el valor de Rluc/Fluc de cada muestra de ARN guía se expresa como un valor relativo cuando se asumió que el valor de Rluc/Fluc de ASR utilizado como testigo referente fue de 1. Se muestra una media aritmética de 4 ensayos independientes.

Tabla 2

Región funcional		Nombre del ARN guía	Valor relativo del valor Rluc/Fluc	Eficiencia de edición del ARN (%)
Testigo (no) referente		ASR	1	N.D.
ARNnp	U6	U6-ASR-STL	3.06	28.5
	U1	ASR-U1	2.04	23.0
	U7	ASR-U7	2.60	32.9
ARNr	5S	5S-ASR-STL	6.76	52.6
Gq		ASR-Gq	2.97	29.5
		Gq-ASR	0.91	N.D.
BoxB		ASR-BoxB	0.54	N.D.
		BoxB-ASR	4.42	33.8
Gq/BoxB		Gq-ASR-BoxB	0.41	N.D.
		BoxB-ASR-Gq	0.68	N.D.
		ASR-Gq-BoxB	2.82	23.6
		Gq-BoxB-ASR	0.58	N.D.

"N.D." representa el límite de detección o menos.

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos mediante el experimento de transfección del Experimento 2 del Ejemplo 6.

En la Tabla 3, se calculó un valor de Rluc/Fluc para corregir la eficacia de la transfección entre las muestras, y se muestran el valor medio aritmético y el valor de desviación estándar de tres pocillos, y el valor de Rluc/Fluc de cada muestra de ARN guía expresado como un valor relativo cuando se asumió que el valor de Rluc/Fluc de ASR utilizado como testigo referente fue de 1.

Tabla 3

Región funcional		Nombre del ARN guía	Valor Rluc/Fluc			Eficiencia de edición del ARN (%)
			Valor relativo	Valor de media aritmética	Valor de desviación estándar	
Testigo (no) referente		ASR	1	0.026	0.0010	11.2
ARNnp	U6	U6-ASR-STL	6.96	0.181	0.0119	71.3
Gq		ASR-Gq	6.23	0.162	0.0040	58.7
		Gq-ASR	2.42	0.063	0.0017	34.2
BoxB		ASR-BoxB	1.58	0.041	0.0023	20.2

	BoxB-ASR	4.96	0.129	0.0102	47.2
Gq/BoxB	Gq-ASR-BoxB	0.65	0.017	0.0011	12.9
	BoxB-ASR-Gq	1.15	0.030	0.0029	17.0
	ASR-Gq-BoxB	6.69	0.174	0.0039	68.4

Cuando la edición del ARN blanco de A a I es inducida en una célula por la proteína ADAR y el ARN guía, el codón de terminación de traducción mutado (UIG) se convierte en Trp cuando se traduce desde el ARNm y se restaura la luminiscencia de Renilla luciferasa. Es decir, se muestra que cuanto mayor sea el valor de Rluc, mayor será la actividad de edición de ARN.

De la Tabla 2, el ARN guía en el que un ARNnp o ARNr 5S está unido a la región antisentido, el ARN guía en el que solo Gq está unido a la región antisentido en el lado 3', el ARN guía en el que solo BoxB está unido a la región antisentido en el lado 5' y el ARN guía en el que Gq y BoxB están unidos a la región antisentido en el lado 3' mostraron un valor relativo del valor de Rluc/Fluc de 2.0 o más con respecto al ARN guía (ASR) compuesto por la región antisentido utilizada como testigo referente.

De la Tabla 3, todos los ARN guía excepto el ARN guía en el que Gq está unido a la región antisentido en el lado 5' y BoxB está unido a este en el lado 3' mostraron un valor de Rluc/Fluc más alto que ASR utilizado a manera de testigo comparativo. En particular, el ARN guía en el que U6 está unido a la región antisentido, el ARN guía en el que solo Gq está unido a la región antisentido en el lado 3', el ARN guía en el que solo BoxB está unido a la región antisentido en el lado 5' y el ARN guía en el que Gq y BoxB están unidos a la región antisentido en el lado 3' mostraron un valor relativo del valor de Rluc/Fluc de 5.0 o más con respecto a ASR utilizado como testigo referente.

Ejemplo 8: Examen de la eficiencia de edición de ARN mediante secuenciación de Sanger

Se recuperaron las células transfectadas en el Ejemplo 6 y se extrajo el ARN total y se purificó de las células recuperadas usando QIAshredder (QIAGEN N.V., Catálogo No. 79656), RNeasy Mini Kit (QIAGEN N.V., Catálogo No. 74106) y el Conjunto de ADNasa libre de RNasa (QIAGEN N.V., Catálogo No. 79254) de acuerdo con el protocolo adjunto. El ARN purificado se sometió nuevamente a un tratamiento de digestión de ADN usando ADNasa I recombinante (libre de RNasa) (Takara Bio Inc., Catálogo No. 2270A) de acuerdo con el protocolo adjunto. El ARN obtenido se sometió a una reacción de transcripción inversa utilizando SuperScript (marca registrada) VILO ™ cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Catalog No. 11754-250) según el protocolo adjunto, obteniendo así un cDNA. El ADNc se utilizó como una plantilla y se realizó una reacción de PCR usando los siguientes cebadores para amplificar un fragmento que contenía un sitio de edición y PrimeSTAR (marca registrada) GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Catálogo No. R050A) de acuerdo con el protocolo adjunto.

Cebadores utilizados en el experimento en la Tabla 2

Cebador directo: ATGGCTTCCAAGGTGTACGACC (SEQ ID NO: 35)

Cebador inverso: TTACTGCTCGTTCTTCAGCACG (SEQ ID NO: 36)

Cebadores utilizados en el experimento en la Tabla 3

Cebador directo: CTCGCTGCAAGCAAATGAAC (SEQ ID NO: 37)

Cebador inverso: TCGTCCCAGGACTCGATCAC (SEQ ID NO: 38)

El fragmento multiplicado por PCR se purificó usando reactivos de limpieza de productos ExoSAP-IT ™ Express PCR (Thermo Fisher Scientific, Inc., Catálogo No. 75001.200.UL) de acuerdo con el protocolo adjunto, y se sometió a una reacción de secuenciación Sanger mediante un analizador de ADN 3730 xl (Applied Biosystems, Inc.) junto con el cebador directo utilizado en la multiplicación de PCR.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos mediante el experimento de transfección del Experimento 1 del Ejemplo 6.

Un archivo de datos de forma de onda (extensión: ab1) obtenido por la reacción de secuenciación de Sanger se analizó mediante el uso de QSVanalyzer (Bioinformatics, 2009, Vol. 25, pp. 3244-3250), y la proporción de intensidad de señal de guanina (G) (G/ (G+A) × 100) se definió como la eficiencia de edición de ARN (%). "N.D." representa el límite de detección o menos. Se muestran los resultados de ejemplos representativos.

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos mediante el experimento de transfección del Experimento 2 del Ejemplo 6.

En la Tabla 3, el archivo de datos de forma de onda obtenido (extensión: .ab1) se analizó mediante QSVanalyzer. La proporción de intensidad de señal corregida de G (G / (G+A) × 100) cuando la intensidad de señal de G de Rluc-W104X no editado se corrigió a 0, la intensidad de señal de A de este se corrigió a 1, la intensidad de señal de G de Rluc de tipo salvaje se corrigió a 1, y la intensidad de señal de A de este se corrigió a 0 se definió como la eficiencia de edición de ARN (%). Se muestran los resultados de ejemplos representativos.

De la Tabla 2, la eficiencia de edición de ARN inducida por ASR utilizada como testigo comparativo fue igual o menor que el límite de detección. En las mismas condiciones, el ARN guía en el que un ARNnp o ARNr 5S está unido a la región antisentido, el ARN guía en el que solo Gq está unido a la región antisentido en el lado 3', el ARN guía en el que solo BoxB está unido a la región antisentido en el lado 5' y el ARN guía en el que Gq y BoxB están unidos a la región antisentido en el lado 3' mostraron una eficiencia de edición de ARN de 23% o más.

El ARN guía de la presente invención que contiene la región antisentido a la que se enlaza la región funcional que se muestra en la Tabla 3 mostró una mayor eficiencia de edición de ARN que la ASR utilizada como testigo referente. En particular, el ARN guía en el que U6 está unido a la región antisentido, el ARN guía en el que solo Gq está unido a la región antisentido en el lado 3', el ARN guía en el que solo BoxB está unido a la región antisentido en el lado 5' y el ARN guía en el que Gq y BoxB están unidos a la región antisentido en el lado 3' mostraron una eficiencia de edición de ARN de 47% o más.

Ejemplo 9: Examen de la eficiencia de edición de ARN dirigida al ARNm de luciferasa de luciérnaga (Fluc)

Se confirmó si el ARN guía de la presente invención muestra una alta eficiencia de edición de ARN incluso para diferentes ARN blanco.

Un plásmido de expresión de ARN guía en el que A en la posición 167 en la región codificante de luciferasa de luciérnaga (Fluc) se clonó en un vector psiCHECK-2 (Promega Corporation, Catálogo No. C8021) se determinó que el objetivo de edición se produjo de la misma manera que en los Ejemplos 1 y 3. Las secuencias de ADN que codifican el ARN guía utilizado para la producción son las siguientes.

Nombre del ARN guía y SEQ ID NO del ADN que codifica para el mismo

U6-ASRf-STL: SEQ ID NO: 39

ASRf-Gq: SEQ ID NO: 40

Gq-ASRf: SEQ ID NO: 41

ASRf-BoxB: SEQ ID NO: 42

BoxB-ASRf: SEQ ID NO: 43

Gq-ASRf-BoxB: SEQ ID NO: 44

BoxB-ASRf-Gq: SEQ ID NO: 45

ASRf-Gq-BoxB: SEQ ID NO: 46

Gq-BoxB-ASRf: SEQ ID NO: 47

La secuencia de ADN contiene una base de purina (G o A) preferible para el sitio de inicio de transcripción de polIII en el lado 5' y una secuencia terminadora de polIII en el lado 3'.

Los plásmidos obtenidos se denominan colectivamente pSUPERneo_gRNAf.

ASRf representa una secuencia base antisentido compuesta por 24 bases complementarias al ARNm indicador de Fluc que contiene el objetivo de edición A, y está compuesta por una secuencia base de ARN codificada por una secuencia de la posición 3 a la posición 26 de la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO: 40.

Un plásmido de expresión del ARN guía para servir a manera de testigo referente también se produjo de la misma forma usando una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 48) que no contiene una región funcional y codifica solamente ASRf.

De la misma manera que en el Experimento 1 del Ejemplo 6, un plásmido de expresión de indicador de Fluc (psiCHECK-2 (Promega Corporation, C8021), el plásmido de expresión de ADAR2 (pAAV-CMV-ADAR2) producido en el Ejemplo 5, el plásmido de expresión de ARN guía (pSUPERneo_gRNAf) y un plásmido portador se mezclaron en una proporción en peso de 1:80:100:19 de modo que la cantidad total fue de 100 ng/pocillo y las células HEK 293 se transfectaron con este usando el Reactivo de Transfección Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Catálogo No. L3000015). El plásmido de expresión del ARN guía para servir a manera de testigo referente también se transfectó de la misma forma. A manera

de plásmido portador, se utilizó un vector que aporta pH (Takara Bio Inc., Catálogo No. 6230).

Se realizó una reacción de PCR de la misma manera que en el Ejemplo 8 (en el caso de la Tabla 2) y se realizó una reacción de secuenciación de Sanger usando cebadores de secuencia. La eficiencia de edición de ARN dirigida al ARNm indicador de Fluc se calculó a partir del archivo de datos de forma de onda de la reacción de secuenciación de Sanger de la misma manera que para la Tabla 2. A continuación se muestran los cebadores utilizados para la reacción de PCR y la reacción de secuenciación de Sanger de esta prueba.

Cebador directo Fluc: ACCCGCTTAAAAGCTTGGC (SEQ ID NO: 49)

Cebador inverso Fluc: CCACGGTAGGCTGAGAAATG (SEQ ID NO: 50)

Cebador de secuencia: CATGCTGTTCAGCAGCTCGC (SEQ ID NO: 51)

Una media aritmética de 3 ensayos independientes se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Región funcional		Nombre del ARN guía	Eficiencia de edición del ARN (%)
Testigo (no) referente		ASRf	5.7
ARNnp	U6	U6-ASRf-STL	17.5
Gq		ASRf-Gq	19.5
		Gq-ASRf	7.3
BoxB		ASRf-BoxB	8.9
		BoxB-ASRf	5.1
Gq/BoxB		Gq-ASRf-BoxB	4.2
		BoxB-ASRf-Gq	18.2
		ASRf-Gq-BoxB	9.2
		Gq-BoxB-ASRf	2.5

El ARN guía en el que U6 está unido a la región antisentido, el ARN guía en el que solo Gq está unido a la región antisentido en el lado 5' o el lado 3', el ARN guía en el que solo BoxB está unido a la región antisentido en el lado 3', el ARN guía en el que BoxB está unido a la región antisentido en el lado 5' y Gq está unido a este en el lado 3', y el ARN guía en el que Gq y BoxB están unidos a la región antisentido en el lado 3' mostraron una mayor eficiencia de edición de ARN que ASRf utilizado como el testigo referente. En términos particulares, el ARN guía en el que U6 está unido a la región antisentido, el ARN guía en el que solo Gq está unido a la región antisentido en el lado 3' y el ARN guía en el que BoxB está unido a la región antisentido en el lado 5' y Gq está unido a este en el lado 3' mostraron una eficiencia de edición de ARN de 17% o más.

Ejemplo 10: Examen de estabilidad intracelular del ARN guía

La estabilidad intracelular de un ARN guía se puede evaluar comparando la cantidad residual del ARN guía después de la inhibición de la transcripción. Significa que cuanto mayor sea la cantidad residual de un ARN guía blanco después de la introducción del ARN guía en una célula, mayor será la estabilidad.

Se cultivaron células HEK 293 en DMEM complementado con FBS al 5%, y se inocularon en una placa de 24 pocillos a 1×10^5 células/0.5 mL y se cultivaron durante la noche a 37 °C en presencia de 5% de CO_2. Al día siguiente, el plásmido de detección de actividad de edición de ARN blanco intracelular (psiCHECK-2_Rluc-W104X) producido en el Ejemplo 4, el plásmido de expresión de ADAR2 (pAAV-CMV-ADAR2) producido en el Ejemplo 5, el plásmido de expresión de ARN guía (pSUPERneo_H1_gRNA o pSUPERneo_U6_gRNA) producido en el Ejemplo 1 o 3 y un plásmido portador se mezclaron en una proporción en peso de 1:40:30:9 de modo que la cantidad total fue de 400 ng/pocillo. A manera de plásmido portador, se utilizó un vector que aporta pH (Takara Bio Inc., Catálogo No. 6230). Las células HEK 293 se transfectaron usando Lipofectamine ™ Reactivo de transfección 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., n.º de catálogo L3000015).

24 horas después de la transfección, se recuperaron las células en algunos pocillos y se determinó que el estado antes de la adición de actinomicina D era de 0 horas. Al mismo tiempo, en los pocillos de los cuales no se recuperaron las células, la solución de cultivo se reemplazó con DMEM complementado con actinomicina D (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Catálogo No. 010-21263) a 5 μg/mL. Se sabe que la actinomicina D se une a un ADN de doble cadena e inhibe la transcripción por la ARN polimerasa. Se recuperaron las células a las 4 horas y 6 horas después de la adición de actinomicina D y se extrajo el ARN total que contenía un ARN guía y se purificó de las células recuperadas usando el Mini Kit miRNeasy (QIAGEN N.V., Catálogo No. 217004) y el Conjunto de ADNasa libre de ARNasa (QIAGEN N.V., Catálogo No. 79254) de acuerdo con el protocolo adjunto. El ARN obtenido se sometió a adición de poliA a un ARN pequeño usando el kit de síntesis de primera cadena de miARN Mir-X (Takara Bio Inc., Catálogo No. 638315) de acuerdo con el protocolo adjunto, y luego se realizó una reacción de transcripción inversa, obteniendo así un ADNc. El ADNc se utilizó como una plantilla, y se realizaron dos tipos de reacciones de PCR de contacto usando PrimeSTAR (marca registrada) GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Catálogo No. R050A). En la reacción de PCR de ARNnp U6 que se expresa de forma endógena en células, se utilizaron cebador directo U6 y cebador inverso U6 unidos a Mir-X miARN qRT-PCR TB Green (marca registrada) Kit (Takara Bio Inc., Catálogo No. 638314). La cantidad de ARNnp U6 intracelular se usó para corregir la cantidad de RNA guía entre las muestras. En la reacción de PCR del ARN guía, se utilizó un cebador que tiene una secuencia (SEQ ID NO: 52) homóloga a ASR y cebador mRQ 3' unido al kit anterior. Las condiciones de reacción de PCR de contacto se componen de una etapa de desnaturalización térmica previa al ciclo a 94 ° C durante 1 minuto, una etapa de amplificación que incluye desnaturalización térmica a 98 ° C durante 10 segundos, recocido a 65 ° C durante 15 segundos y una reacción de extensión a 68 ° C durante 30 segundos y una etapa de reacción de extensión a 72 ° C durante 3 minutos. Entre estos, en los

ciclos primero a quinto en la etapa de amplificación, se emplea un método de toma de contacto en el que la temperatura de recocido se reduce en 1 °C después de cada paso del ciclo, y la temperatura de recocido en el sexto ciclo y posteriormente se mantiene a 60 °C. La etapa de multiplicación mediante PCR del ARNnp U6 intracelular se realizó para un total de 23 ciclos, y la etapa de multiplicación por PCR del ARN guía se llevó a cabo para un total de 20 ciclos.

Cada producto de PCR se sometió a electroforesis con un gel de agarosa al 2 % y los resultados de la electroforesis se fotografiaron con ChemiDoc. ™ Sistema de imágenes táctiles (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Las bandas de PCR se cuantificaron usando el software Image Lab 6.1 para Windows (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

En la Tabla 5, se calculó un valor obtenido mediante la corrección de la intensidad de señal de la banda de PCR usando el ARN guía como plantilla por la intensidad de señal de la banda de PCR usando el ARNnp intracelular U6 como plantilla (valor de ARN guía/U6). Como la cantidad residual del ARN guía, se asumió que el valor antes de la adición de actinomicina D era 1, y se muestra el valor relativo del valor de ARN guía/U6 a las 4 horas y 6 horas después de la adición de actinomicina D. Se muestra una media aritmética de 3 ensayos independientes.

Tabla 5

Región funcional		Nombre del ARN guía	Cantidad residual de ARN guía	
			4 horas	6 horas
Testigo (no) referente		ASR	0.36	0.40
ARNnp	U6	U6-ASR-STL	0.46	0.52
Gq		ASR-Gq	0.48	0.59
BoxB		BoxB-ASR	0.57	0.68

Significa que cuanto mayor sea la cantidad residual de un ARN guía después de la adición de actinomicina D, mayor será la estabilidad intracelular del ARN guía.

El ARN guía de la presente invención que se muestra en la Tabla 5 mostró una gran cantidad residual del ARN guía a las 4 horas y 6 horas después de la adición de actinomicina D en comparación con ASR utilizado como testigo referente, y se confirmó que tenía una gran estabilidad.

Aplicación Industrial

El ARN guía de la presente invención es útil para editar un ARN blanco, y una composición farmacéutica que contiene el ARN guía de la presente invención, un ácido nucleico que codifica el ARN guía de la presente invención, el vector de expresión de la presente invención o el polipéptido de la presente invención es útil porque se puede utilizar para diversas enfermedades que se pueden prevenir o tratar mediante la edición de un ARN blanco, que incluye enfermedades hereditarias.

Texto Libre del Listado de Secuencias

SEQ ID NOS: 1 a 7: ARN sintético

SEQ ID NOS: 10 a 52: ADN sintético

LISTADO DE SECUENCIAS

REIVINDICACIONES

1. Un ARN guía para editar un ARN blanco mediante ADAR, que comprende al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y puede formar una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y donde el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR.

2. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la al menos una región funcional está directamente unida a la región antisentido o unida a la región antisentido a través de un enlazador.

3. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la región antisentido comprende una base para formar un par de bases no emparejadas con el ARN blanco.

4. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la región funcional es una región que incluye una secuencia base que tiene una o más funciones entre funciones que incluyen estabilización del ARN guía, localización del ARN guía a un núcleo, localización del ARN guía a citoplasma, promoción de la formación de cadena doble entre el ARN blanco y la región antisentido, inhibición de la formación de cadena doble no específica por la región antisentido y estabilización de un complejo formado a partir del ARN blanco y la región antisentido.

5. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp, una región compuesta por una secuencia de ARNr, una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla o cualquier combinación de las mismas.

6. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNnp y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla.

7. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la región compuesta por una secuencia de ARNnp es una región compuesta por una secuencia de ARNnp U6, una región compuesta por una secuencia de ARNnp U1 o una región compuesta por una secuencia de ARNnp U7.

8. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la región funcional es una región compuesta por una secuencia de ARNr y una región opcionalmente contenida compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla.

9. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la región compuesta por una secuencia de ARNr es una región compuesta por una secuencia de ARNr 5S.

10. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la región funcional es una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, o una región compuesta por una secuencia base para formar una estructura asa en horquilla, o una combinación de las mismas.

11. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

en donde el ARN guía comprende la región antisentido, la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura cuádruplex de guanina, una región funcional adicional opcionalmente contenida y un enlazador opcionalmente contenido, y

en donde la región antisentido, la región funcional compuesta por una secuencia base a partir de una estructura cuádruplex de guanina y la región funcional adicional opcionalmente contenida están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3'.

12. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

en donde el ARN guía comprende una región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla, la región antisentido, una región funcional adicional opcionalmente contenida y un enlazador opcionalmente contenido, y

en donde la región funcional compuesta por una secuencia base para formar una estructura de asa en horquilla y la región antisentido están unidas en este orden desde el lado 5' al lado 3'.

13. Un sistema para editar un ARN blanco, que comprende el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y ADAR.

14. Un ácido nucleico, que codifica el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Un vector de expresión, que comprende un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

16. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 15, en donde además comprende un ácido nucleico que codifica para ADAR.

17. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el ADAR es ADAR1 o ADAR2.

18. Una célula hospedera en la que se ha introducido el vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.

19. Un método para producir un vector de expresión, que comprende cultivar la célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 18.

20. Una composición farmacéutica, que comprende el vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

21. Una composición farmacéutica, que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 15, un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica para ADAR, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

22. Un método para editar un ARN blanco, que comprende introducir un ácido nucleico que codifica para el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en una célula, un virus o lo similar.

23. Un polinucleótido para editar un ARN blanco mediante ADAR, que comprende al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y puede formar una cadena doble con el ARN blanco, en donde la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y donde el polinucleótido no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR.

RESUMEN

Objeto: Proporcionar un ARN guía antisentido para editar un ARN blanco mediante ADAR.

Solución: Un ARN guía antisentido para editar un ARN blanco mediante ADAR, que contiene al menos una región funcional y una región antisentido que es complementaria a una parte del ARN blanco y puede formar una cadena doble con el ARN blanco, en la que la al menos una región funcional está unida a la región antisentido y en la que el ARN guía no contiene sustancialmente una secuencia base de reclutamiento de ADAR.

Dibujo seleccionado: Ninguna