

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 293**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2004** **E 04722479 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013** **EP 1606407**

54 Título: **Modulación de identificación de exones en pre-ARNm por interferencia con la estructura secundaria del ARN**

30 Prioridad:

21.03.2003 WO PCT/NL03/00214

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

31.03.2014

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (100.0%)
ALBINUSDREEF 2
2333 ZA LEIDEN, NL**

72 Inventor/es:

**VAN OMMEN, GARRIT-JAN, BOUDEWIJN;
VAN DEUTEKOM, JUDITH, CHRISTINA,
THEODORA;
DEN DUNNEN, JOHANNES, THEODORUS y
AARTSMA-RUS, ANNEMIEKE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 452 293 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modulación de identificación de exones en pre-ARNm por interferencia con la estructura secundaria del ARN

- 5 [0001] La invención se refiere a los campos de la biología molecular y la medicina. Más concretamente la invención se refiere a un método para generar un oligonucleótido para la reestructuración de ARNm producido a partir de pre-ARNm.
- 10 [0002] El dogma central de la biología es que la información genética reside en el ADN de una célula y se expresa sobre la transcripción de esta información, donde después de la producción de la proteína codificada continua la maquinaria de traducción de la célula. Esta visión del flujo de la información genética ha dado lugar a la estrategia predominantemente basada en el ADN para interferir con el contenido proteínico de una célula. Este punto de vista está cambiando lentamente y se están buscando alternativas a la interferencia a nivel del ADN.
- 15 [0003] En los eucariotas superiores la información genética para proteínas en el ADN de la célula se codifica en exones, que están separados entre sí por secuencias intrónicas. Estos intrones son muy largos en algunos casos. La maquinaria de transcripción genera un pre-ARNm que contiene tanto exones como intrones, mientras la maquinaria de empalme, frecuentemente ya durante la producción del pre-ARNm, genera la auténtica región de codificación para la proteína mediante el empalme de los exones presentes en el pre-ARNm.
- 20 [0004] Aunque se sabe mucho acerca de los procesos reales implicados en la generación de un ARNm a partir de un pre-ARNm, también mucho permanece oculto. En la presente invención se ha demostrado que es posible influir en el proceso de empalme de manera que se produzca un ARNm diferente. El proceso permite la reestructuración predecible y reproducible de ARNm producido por una maquinaria de empalme. Un oligonucleótido capaz de hibridarse con pre-ARNm en una ubicación de un exón que está normalmente incluido en el ARNm maduro puede dirigir la exclusión del exón así escogido como diana o una parte del mismo.
- 25 [0005] En la presente invención se proporcionan medios y métodos para el diseño de oligonucleótidos complementarios apropiados. Con este fin la invención proporciona un método para generar un oligonucleótido determinando, a partir de una estructura secundaria (predicha) de ARN de un exón, una región que adopta una estructura que se hibrida con otra parte de dicho ARN (estructura cerrada) y una región que no se hibrida con dicha estructura (estructura abierta), y consecuentemente generando un oligonucleótido que, al menos en parte, es complementario a dicha estructura abierta y que, al menos en parte, es complementario a dicha estructura cerrada. Las moléculas de ARN presentan estructuras secundarias fuertes, principalmente debido al apareamiento de bases en tramos complementarios o parcialmente complementarios dentro del mismo ARN. Se piensa desde hace mucho tiempo que las estructuras en el ARN juegan un papel en la función del ARN. Sin estar obligado por la teoría, se cree que la estructura secundaria del ARN de un exón juega un papel en la estructuración del proceso de empalme. A través de su estructura, un exón es reconocido como una parte que necesita ser incluida en el ARNm. Aquí, esta función de señalización es referida como una señal de inclusión de exón. Un oligonucleótido complementario de la divulgación es capaz de interferir con la estructura del exón y de este modo capaz de interferir con la señal de inclusión del exón. Se ha descubierto que muchos oligonucleótidos complementarios de hecho incluyen esta capacidad, algunos más eficazmente que otros. Los oligonucleótidos de la divulgación, es decir, aquellos con el mencionado solapamiento dirigido hacia estructuras cerradas y abiertas en el ARN de exón nativo, son una selección a partir de todos los oligonucleótidos posibles. La selección abarca oligonucleótidos que pueden interferir eficazmente con una señal de inclusión de exón. Sin estar obligado por la teoría se piensa que el solapamiento con una estructura abierta mejora la eficiencia de invasión del oligonucleótido (es decir, aumenta la eficiencia con la cual el oligonucleótido puede penetrar la estructura), mientras que el solapamiento con la estructura cerrada aumenta posteriormente la eficiencia de interferencia con la estructura secundaria del ARN del exón y de este modo interfiere con la señal de inclusión de exón. Se ha descubierto que la longitud de complementariedad parcial tanto para la estructura cerrada como para la abierta no está sujeta a grandes restricciones. Hemos observado eficiencias altas en oligonucleótidos con longitudes de complementariedad variables en ambos tipos de estructuras. El término complementariedad se utiliza en este caso para referirse a un tramo de ácidos nucleicos que puede hibridarse con otro tramo de ácidos nucleicos bajo condiciones fisiológicas. No es, por consiguiente, en absoluto requerido que todas las bases en la región de complementariedad sean capaces de aparearse con bases en la cadena opuesta. Por ejemplo, al diseñar el oligonucleótido uno puede querer incorporar un residuo que no se aparee con la base en la cadena complementaria. Los apareamientos erróneos se pueden permitir hasta cierto punto si, bajo las circunstancias en la célula, el tramo de nucleótidos es capaz de hibridarse con la parte complementaria. En una realización preferida, una parte complementaria (tanto a la mencionada estructura abierta como a la mencionada estructura cerrada) comprende al menos 3 o preferiblemente al menos 4 nucleótidos consecutivos. Las regiones complementarias son preferiblemente diseñadas de manera que, cuando se combinan, son específicas para el exón en el pre-ARNm. Tal especificidad se puede crear con varias longitudes de regiones complementarias ya que ésta depende de las secuencias reales en otro (pre-)ARNm en el sistema. El riesgo de que también uno o más pre-ARNm sean capaces de hibridarse con el oligonucleótido decrece con el incremento de tamaño del oligonucleótido. Está claro que los oligonucleótidos que contienen apareamientos erróneos en la región de complementariedad, pero que retienen la capacidad para hibridarse con la(s) región(es) seleccionada(s) en el pre-ARNm, se pueden usar en la presente invención. No obstante, es preferible que al menos las partes complementarias no incluyan tales apareamientos erróneos ya que éstas tienen típicamente una eficiencia y especificidad más altas que los oligonucleótidos que tienen tales apareamientos en una o más regiones complementarias. Se piensa que fuerzas de hibridación mayores (es decir, un número creciente de
- 30
35
40
45
50
55
60
65

interacciones con la cadena opuesta) son favorables para aumentar la eficiencia del proceso de interferencia con la maquinaria de empalme del sistema.

[0006] La estructura secundaria se analiza mejor en el contexto del pre-ARNm donde el exón reside. Tal estructura se puede analizar en el ARN real. No obstante, es posible actualmente predecir bastante bien la estructura secundaria de una molécula de ARN (con costes mínimos de energía) usando programas de modelado de estructuras. Un ejemplo no limitante de un programa adecuado es el servidor RNA mfold versión 3.1 (Mathews et al 1999, J. Mol. Biol. 288: 911-940). Una persona cualificada en la técnica será capaz de predecir, con reproducibilidad adecuada, una estructura probable del exón dada la secuencia de nucleótidos. Las mejores predicciones se obtienen cuando se proporciona a tales programas de modelado las secuencias tanto del exón como del intrón flanqueante. Típicamente no es necesario modelar la estructura de todo el pre-ARNm.

[0007] En un primer aspecto se proporciona un método según la reivindicación 1.

[0008] Las estructuras abierta y cerrada a las que el oligonucleótido es dirigido, son preferiblemente adyacentes entre sí. Se piensa que de esta manera el alineamiento del oligonucleótido con la estructura abierta induce la apertura de la estructura cerrada con lo cual el alineamiento progresa en esta estructura cerrada. A través de esta acción la estructura previamente cerrada asume una conformación diferente. La conformación diferente produce la interrupción de la señal de inclusión de exón. No obstante, cuando secuencias de apareamientoceptoras y/o donadoras potenciales (crípticas) están presentes en el exón elegido, ocasionalmente una nueva señal de inclusión de exón se genera definiendo un (neo) exón diferente, es decir, con un extremo 5' diferente, un extremo 3' diferente o ambos. Este tipo de actividad está dentro del ámbito de la presente invención ya que el exón escogido como diana es excluido del ARNm. La presencia de un nuevo exón, que contiene parte del exón escogido, en el ARNm no altera el hecho de que el exón escogido, como tal, es excluido. La inclusión de un neoexón puede ser vista como un efecto secundario que ocurre sólo ocasionalmente. Hay dos posibilidades cuando el salto de exón se utiliza para restaurar (parte de) un marco abierto de lectura que fue interrumpido como resultado de una mutación. Una es que el neoexón sea funcional en la restauración del marco de lectura, mientras que en el otro caso el marco de lectura no se restaura. Cuando se seleccionan los oligonucleótidos para restaurar marcos de lectura mediante saltos de exón está, por supuesto, claro que bajo estas condiciones sólo se seleccionan aquellos oligonucleótidos que de hecho suponen saltos de exón que restauren el marco abierto de lectura, con o sin un neoexón.

[0009] El pre-ARNm puede estar sujeto a varios eventos de empalme, por ejemplo, a través de empalme alternativo. Tales eventos pueden ser inducidos o catalizados por el entorno de una célula o sistema de empalme artificial. Así, del mismo pre-ARNm se pueden producir varios ARNm diferentes. Los ARNm diferentes incluían todas las secuencias exónicas, ya que esa es la definición de un exón. No obstante, la variabilidad del contenido de ARNm necesita una definición del término exón en la presente invención. Un exón según la invención es una secuencia presente tanto en el pre-ARNm como en el ARNm producido a partir de éste, donde la secuencia incluida en el ARNm está, en el pre-ARNm, flanqueada en un lado (primer y último exón) o ambos lados (cualquier otro exón excepto el primer y el último exón) por secuencias no presentes en el ARNm. En principio cualquier ARNm producido a partir del pre-ARNm cumple esta definición. No obstante, para la presente invención, se prefieren los llamados ARNm dominantes, es decir ARNm que constituye al menos el 5% del ARNm producido a partir del pre-ARNm bajo las condiciones establecidas. El virus de inmunodeficiencia humana en particular usa el empalme alternativo en grado máximo. Algunos productos proteínicos muy importantes se producen a partir de ARNm, constituyendo incluso menos del 5% del ARNm total producido a partir de dicho virus. El ARN genómico de los retrovirus puede ser visto como pre-ARNm para cualquier producto de empalme derivado de éste. Como el empalme alternativo puede variar en diferentes tipos de células los exones se definen como exones en el contexto de las condiciones de empalme usadas en ese sistema. Como ejemplo hipotético; un ARNm en una célula muscular puede contener un exón que está ausente en un ARNm producido a partir del mismo pre-ARNm en una célula nerviosa. De forma similar, el ARNm en una célula cancerosa puede contener un exón no presente en el ARNm producido a partir del mismo ARNm en una célula normal.

[0010] El empalme alternativo puede ocurrir por empalme a partir del mismo pre-ARNm. No obstante, el empalme alternativo también puede ocurrir a través de una mutación en el pre-ARNm, por ejemplo generando una secuencia adicional de empalme aceptora y/o donadora. Tales secuencias de empalme alternativo son frecuentemente referidas como secuencias aceptoras/donadoras de empalme críptico. Tales sitios de empalme críptico pueden dar lugar a nuevos exones (neoexones). La inclusión de neoexones en el ARNm producido se puede evitar al menos en parte utilizando un método de la divulgación. En el caso de que un neoexón esté flanqueado por una secuencia donadora/aceptora de empalme críptico y una "normal", el neoexón incluye el antiguo (paleo) exón. Si en este caso la secuencia donadora/aceptora de empalme original, cuyo lugar ha sido ocupado por la donadora/aceptora de empalme críptico, sigue estando presente en el pre-ARNm, es posible mejorar la producción del ARNm que contiene el paleoexón interfiriendo con la señal de reconocimiento de exón del neoexón. Esta interferencia puede ser tanto en la parte del neoexón correspondiente al paleoexón como en la parte adicional de tales neoexones. Este tipo de salto de exón se puede ver como una corrección de empalme.

[0011] La técnica de salto de exón se puede usar para muchos fines diferentes. No obstante, el salto de exón se usa preferiblemente para reestructurar el ARNm que se produce a partir del pre-ARNm que exhibe empalme no deseado en un sujeto. La reestructuración se puede utilizar para reducir la cantidad de proteína producida por la célula. Esto es útil

cuando la célula produce una proteína no deseada en particular. En la divulgación, no obstante, la reestructuración se utiliza para promover la producción de una proteína funcional en una célula, es decir, la reestructuración conduce a la generación de una región de codificación para una proteína funcional. Ésta última divulgación se usa preferiblemente para restaurar un marco abierto de lectura que se perdió como resultado de una mutación. Los genes preferidos comprenden un gen de la distrofia muscular de Duchenne, un gen de colágeno VI alfa 1 (COL6A1), un gen de miopatía miotubular 1 (MTM1), un gen de disferlina (DYSF), un gen de laminina alfa 2 (LAMA2), un gen de la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DME) y/o un gen de calpaína 3 (CAPN3). La invención se describe posteriormente mediante ejemplos extraídos del gen de la distrofia muscular de Duchenne. Aunque este gen constituye un gen particularmente preferido en la presente invención, la invención no se limita a este gen.

[0012] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (DMB) son ambas provocadas por mutaciones en el gen DMD, que se encuentra en el cromosoma X y los códigos para la distrofina (1-6). La DMD tiene una incidencia de 1:3500 en machos recién nacidos. Los pacientes sufren de debilidad muscular progresiva, están atados a una silla de ruedas antes la edad de 13 años y frecuentemente mueren antes la tercera década de su vida (7). La generalmente más leve DMB tiene una incidencia de 1:20,000. Los pacientes de DMB frecuentemente mantienen la capacidad de andar durante más de 40 años y tienen esperanzas de vida más largas en comparación con los pacientes de DMD (8).

[0013] La distrofina es un componente esencial del complejo distrofina-glicoproteína (CGD), el cual, entre otras cosas, mantiene la estabilidad de la membrana de las fibras musculares (9,10). Las mutaciones de desplazamiento de marco en el gen DMD suponen una deficiencia de distrofina en las células musculares. Ésta se acompaña de niveles reducidos de otras proteínas CGD y produce el fenotipo severo encontrado en pacientes con DMD (11,12). Las mutaciones en el gen DMD que dejan el marco de lectura intacto, generan distrofinas más cortas pero parcialmente funcionales, asociadas a la menos severa DMB (13,14).

[0014] A pesar de los amplios esfuerzos, ninguna terapia eficaz y clínicamente aplicable para pacientes con DMD ha sido desarrollada todavía (15), aunque se puede conseguir retrasar la aparición y/o progresión de las manifestaciones de la enfermedad mediante terapia de glucocorticoide (16). Resultados prometedores en una terapia genética dirigida a restaurar el marco de lectura del pre-ARNm de distrofina en células del modelo de ratón mdx y pacientes con DMD (17-23) han sido recientemente reseñados por nosotros y otros grupos. Mediante el salto escogido de un exón específico, un fenotipo DMD se puede convertir en un fenotipo DMB más leve. El salto de un exón puede ser inducido por el enlace de oligorribonucleótidos en antisentido (AON) dirigido a uno o a ambos sitios de empalme o a secuencias internas de exón. Ya que un exón sólo será incluido en el ARNm cuando ambos sitios de empalme sean reconocidos por el complejo espliceosoma, los sitios de empalme son dianas obvias para los AON. Esto ha demostrado tener éxito, pero con eficacia y eficiencia variables (17, 18, 20,21). Hemos conjeturado que dirigirse a secuencias internas de exón puede incrementar la especificidad y reducir la interferencia con la propia maquinaria de empalme. Algunos exones tienen sitios de empalme débiles y parecen requerir el enlace de una proteína SR con una secuencia de reconocimiento de exón (ERS) o un potenciador de empalme exónico (ESE) para ser debidamente reconocidos por la maquinaria de empalme (24). Las proteínas SR son una familia altamente conservada de fosfoproteínas ricas en arginina/serina, asociadas al espliceosoma, esenciales para el empalme de pre-ARNm (50,51). Las proteínas SR parecen actuar al principio en el empalme promoviendo la identificación de los sitios de empalme y el ensamblaje de espliceosoma. Las proteínas SR también juegan un papel regulador porque pueden determinar el uso de sitios de empalme alternativo *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas SR parecen ser reclutadas de "speckles" nucleares, en las que se encuentran concentradas, a sitios de transcripción para coordinar espacialmente la transcripción y el empalme de pre-ARNm en el núcleo celular (49,52). Se ha encontrado que las mutaciones puntuales disruptivas o los AON que bloquean estas secuencias suponen saltos de exón (19, 22,24-28). Usando AON internos del exón específicos para una secuencia de tipo ERS en el exón 46, fuimos previamente capaces de modular el patrón de empalme en miotubos cultivados de dos pacientes con DMD diferentes con una delección del exón 45 (19). Siguiendo el tratamiento con AON, se saltó el exón 46, lo que resultó en un marco de lectura restaurado y en la inducción de síntesis de distrofina en al menos el 75% de las células. Hemos mostrado recientemente que los saltos de exón pueden también ser eficazmente inducidos en las células musculares de control humanas para 15 diferentes exones DMD usando AON internos de exón (23, resultados no publicados). En contraste con la opinión precedente de que los saltos sólo se pueden lograr con sitios de empalme débiles o exones que contienen secuencias tipo ERS, hemos visto que los exones que se saltaron en la presente divulgación mayoritariamente no tienen sitios de empalme débiles ni contienen secuencias tipo ERS. De esta forma el enlace de los AON con el exón escogido como diana, per se, es suficiente para causar saltos de exón, tanto interfiriendo con uno o más componentes de la maquinaria de empalme como alterando la estructura secundaria del ARN de manera que la maquinaria de empalme ya no reconozca el exón. En una realización preferida el exón que se va a saltar comprende los exones 2, 8, 9, 17, 19, 29, 40-46, 48-53, 55 o 59. Más preferiblemente, los exones 2, 8, 9, 17, 40, 41, 42, 44, 46, 48, 49-52, 55 o 59. En otra realización el exón que se va a saltar comprende los exones 2, 29, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51,53 o 55.

[0015] Cualquier oligonucleótido que cumpla los requisitos de la invención se puede utilizar para inducir un salto de exón en el gen *DMD*. En la divulgación, un oligonucleótido comprende una secuencia como la que se representa como activa en los saltos de exón en la tabla 2 o un equivalente funcional de la misma que comprenda una capacidad de hibridación similar, preferiblemente la misma, en tipo, no necesariamente en cantidad. Se divulga un oligonucleótido que comprende una secuencia como la que se representa en la tabla 2, derivada de los exones 2, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46,

48, 49, 50, 51, 53 o 55, activos en saltos de exón. La divulgación, de este modo, proporciona además un oligonucleótido de la tabla 2 o un equivalente del mismo. La divulgación proporciona un oligonucleótido de la tabla capaz de inducir saltos de exón tal como se representa en la tabla 2. La divulgación proporciona adicionalmente un oligonucleótido de la tabla 2, complementario a los exones 2, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 53 o 55 del gen DMD humano.

[0016] La corrección del marco de lectura se puede lograr saltando uno o dos exones que flanquean una delección, saltando exones dentro del marco con una mutación sin sentido o saltando exones duplicados. Esto produce proteínas similares a aquellas encontradas en varios pacientes con DMB (2, 29). Una inspección de la base de datos sobre mutaciones DMD en Leiden [www.dmd.nl; (30)] muestra que podemos, de esta forma, corregir más del 75% del DMD causante de mutaciones (ver tabla 4). Mostramos el efecto terapéutico real del salto de exón para 7 mutaciones diferentes. En todos los cultivos de células musculares de paciente, fuimos capaces de restaurar la síntesis de distrofina en el 75% al 80% de las células tratadas.

[0017] El oligonucleótido complementario generado a través de un método de la invención es preferiblemente complementario a una parte consecutiva de entre 13 y 50 nucleótidos de dicho ARN del exón. En otra realización el oligonucleótido complementario generado a través de un método de la invención es complementario a una parte consecutiva de entre 16 y 50 nucleótidos de dicho ARN del exón. Preferiblemente, el oligonucleótido es complementario a una parte consecutiva de entre 13 y 25 nucleótidos de dicho ARN del exón. Preferiblemente entre 14 y 25 nucleótidos de dicho ARN del exón. Diferentes tipos de ácidos nucleicos pueden ser utilizados para generar el oligonucleótido. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende ARN, ya que los híbridos ARN/ARN son muy estables. Como uno de los objetivos de la técnica de salto de exón es dirigir el empalme en los sujetos, se prefiere que el ARN del oligonucleótido comprenda una modificación que proporcione ARN con una propiedad adicional, por ejemplo, resistencia a endonucleasas y RNasa H, fuerza de hibridación adicional, estabilidad aumentada (por ejemplo en un fluido corporal), flexibilidad aumentada o disminuida, toxicidad reducida, transporte intracelular aumentado, especificidad de tejido, etc. Preferiblemente dicha modificación comprende una modificación del oligorribonucleótido 2'-O-metil-fosforotioato. Preferiblemente dicha modificación comprende una modificación del oligodesoxirribonucleótido 2'-O-metil-fosforotioato. Aquí se divulga un oligonucleótido híbrido que comprende un oligonucleótido que comprende una modificación del oligo(desoxi)ribonucleótido 2'-O-metil-fosforotioato y un ácido nucleico bloqueado. Esta combinación en particular comprende una mejor especificidad de secuencia en comparación con un equivalente que consiste en un ácido nucleico bloqueado y comprende efectividad mejorada en comparación con un oligonucleótido que consta de una modificación del oligo(desoxi)ribonucleótido 2'-O-metil-fosforotioato.

[0018] Con la aparición de la tecnología de imitación de ácidos nucleicos se ha hecho posible generar moléculas que tienen características de hibridación similares, preferiblemente las mismas, en tipo, no necesariamente en cantidad que las del propio ácido nucleico. Tales equivalentes son por supuesto también parte de la invención. Ejemplos de tales imitadores equivalentes son el ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado y/o un morfolino fosforodiamidato. Ejemplos adecuados no limitantes de equivalentes de oligonucleótidos de la divulgación se pueden encontrar en (Wahlestedt, C. et al. Potent and non-toxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5633-8. (2000). Elayadi, A.N. & Corey, D.R. Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. Curr Opin Investig Drugs 2, 558-61. (2001). Larsen, H.J., Bentin, T. & Nielsen, P.E. Antisense properties of peptide nucleic acid. Biochim Biophys Acta 1489, 159-66. (1999). Braasch, D.A. & Corey, D.R. Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. Biochemistry 41, 4503-10. (2002). Summerton, J. & Weller, D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7, 187-95 (1997). Los híbridos de uno o más de los equivalentes entre sí y/o junto con un ácido nucleico son, por supuesto, también parte de la invención. En una realización preferida un equivalente comprende un ácido nucleico bloqueado, ya que el ácido nucleico bloqueado muestra una afinidad de diana más alta y toxicidad reducida y por lo tanto muestra una mayor eficiencia en el salto de exón.

[0019] Un oligonucleótido de la divulgación típicamente no tiene que solaparse con un donador de empalme o aceptor de empalme del exón.

[0020] Un oligonucleótido de la divulgación, o el equivalente del mismo, puede, por supuesto, ser combinado por otros métodos para interferir con la estructura de un ARNm. Es, por ejemplo, posible incluir en un método al menos otro oligonucleótido que es complementario al menos a otro exón en el pre-ARNm. Esto puede utilizarse para prevenir la inclusión de dos o más exones de un pre-ARNm en el ARNm producido a partir de este pre-ARNm. En una realización preferida, el mencionado otro oligonucleótido es un oligonucleótido, o equivalente del mismo, generado a través de un método de la invención. Esta parte de la divulgación es adicionalmente referida como salto de doble o multi-exón. En la mayoría de los casos el salto de doble exón produce la exclusión sólo de los dos exones escogidos (complementarios) del pre-ARNm. No obstante, en otros casos se encontró que los exones escogidos y toda región entre dichos exones en dicho pre-ARNm no estaban presentes en el ARNm producido incluso cuando otros exones (los exones que intervienen) estaban presentes en tal región. Este multi salto fue notablemente de esta forma para la combinación de oligonucleótidos obtenidos del gen DMD, donde un oligonucleótido para el exón 45 y un oligonucleótido para el exón 51 se añadieron a una célula que transcribía el gen *DMD*. Tal configuración resultó en la producción de ARNm que no contenía los exones 45 a 51. Aparentemente, la estructura del pre-ARNm en presencia de los oligonucleótidos mencionados era tal que la maquinaria de empalme era estimulada para conectar los exones 44 y 52 entre sí.

[0021] En un segundo aspecto se proporciona un método según la reivindicación 14.

[0022] En la presente divulgación se ha encontrado posible promover específicamente el salto también de los exones que intervienen, proporcionando una unión entre los dos oligonucleótidos complementarios. Con este fin la divulgación proporciona un compuesto capaz de hibridarse con al menos dos exones en un pre-ARNm codificado por un gen, dicho compuesto que comprende al menos dos partes, donde una primera parte comprende un oligonucleótido con al menos 8 nucleótidos consecutivos que son complementarios a un primero de los mencionados, al menos, dos exones y donde una segunda parte comprende un oligonucleótido con al menos 8 nucleótidos consecutivos que son complementarios a un segundo exón en dicho pre-ARNm. Las, al menos, dos partes se unen en dicho compuesto para formar una única molécula. La unión puede ser a través de cualquier medio pero es preferiblemente llevado a cabo a través de una unión de nucleótidos. En este último caso el número de nucleótidos que no contienen un solapamiento entre uno u otro exón complementario puede ser cero, pero está preferiblemente entre 4 y 40 nucleótidos. La fracción que se une puede ser cualquier tipo de fracción capaz de unir oligonucleótidos. Actualmente, muchos compuestos diferentes que imitan características de hibridación de oligonucleótidos están disponibles. Un compuesto tal es también adecuado para la presente divulgación si tal equivalente comprende características de hibridación similares en tipo, no necesariamente en cantidad. Equivalentes adecuados fueron mencionados anteriormente en esta descripción. Uno o, preferiblemente, más de los oligonucleótidos en el compuesto son generados por un método para generar un oligonucleótido de la presente invención. Tal y como se ha mencionado, los oligonucleótidos de la divulgación no tienen que consistir sólo en oligonucleótidos que contribuyan a la hibridación del exón escogido. Puede haber material adicional y/o nucleótidos añadidos.

[0023] Tal y como se ha mencionado, un gen preferido para reestructurar el ARNm es el gen *DMD*. El gen *DMD* es un gen grande, con muchos exones diferentes. Considerando que el gen se localiza en el cromosoma X, los chicos son mayoritariamente afectados, aunque las chicas también pueden ser afectadas por la enfermedad, ya que pueden recibir una copia mala del gen a través ambos padres o sufren de una inactivación particularmente sesgada del alelo funcional debido a una inactivación particularmente sesgada del cromosoma X en sus células musculares. La proteína es codificada por una multitud de exones (79) sobre un rango de al menos 2,6 Mb. Los defectos pueden ocurrir en cualquier parte del gen *DMD*. El salto de un exón particular o exones particulares puede, muy a menudo, suponer un ARNm reestructurado que codifica una proteína distrofina más corta de lo normal pero al menos parcialmente funcional. Un problema práctico en el desarrollo de un medicamento basado en tecnología de salto de exón es la multitud de mutaciones que pueden suponer una deficiencia en la proteína distrofina funcional en la célula. A pesar del hecho de que múltiples mutaciones diferentes ya se pueden corregir mediante el salto de un único exón, esta multitud de mutaciones, requiere la generación de un gran número de diferentes fármacos ya que para diferentes mutaciones se necesita saltar diferentes exones. Una ventaja de un compuesto de la divulgación, es decir, un compuesto capaz de inducir el salto de dos o más exones, es que más de un exón se puede saltar con un único fármaco. Esta propiedad no es sólo, en la práctica, muy útil en cuanto a que sólo se necesita generar un número limitado de fármacos para tratar muchas mutaciones diferentes de Duchenne o Becker. Otra opción abierta ahora a la persona cualificada en la técnica es la de seleccionar proteínas distrofina reestructuradas particularmente funcionales y producir compuestos capaces de generar estas proteínas distrofina preferidas. Tales resultados finales preferidos son referidos adicionalmente como distrofinas de fenotipo leve. La estructura de la proteína distrofina normal se puede representar esquemáticamente como dos extremos que tienen función estructural (microesferas), conectados entre sí por una barra larga al menos parcialmente flexible. Esta barra se acorta en muchos pacientes de Becker. La divulgación proporciona un método para tratar un paciente con DMD que comprende una mutación tal y como se representa en la tabla 4, que comprende proporcionar a dicho paciente un oligonucleótido eficaz para inducir el salto del exón mencionado en la primera columna de 4 o un equivalente del mismo. En la divulgación dicho oligonucleótido comprende un oligonucleótido eficaz para inducir el salto de exón mencionado en la tabla 2 o un equivalente del mismo.

[0024] Las observaciones mencionadas anteriormente llevan a la conclusión de que, no tanto la longitud de la barra sino la presencia de una barra y su composición (respecto a las regiones particulares de bisagra en la proteína), son cruciales para la función per se de la proteína distrofina. Aunque el tamaño de la barra puede tener un impacto en la cantidad de funcionalidad de la proteína (Becker) resultante, hay muchas excepciones notables. Estas excepciones se detallarán más adelante. Hay mutaciones especialmente benignas que pueden tener una barra muy corta. Los inventores notaron que muchos más tipos diferentes de pacientes de Becker deberían haber sido detectados en la población de pacientes. No obstante, algunos tipos de proteínas distrofina acortadas, que según esta hipótesis deberían tener un fenotipo de Becker, no se detectan en la población humana. Para algunas de estas formas "teóricas" de Becker esto podría ser solo una cuestión de azar. No obstante, en la divulgación se ha encontrado que, al menos algunos de estos pacientes "potenciales" de Becker tienen un fenotipo tan benigno que los sujetos que tienen estos tipos de mutaciones no se presentan ellos mismos ante un médico o no se diagnostica que sufran la enfermedad de Becker. Con un compuesto de la divulgación es posible reestructurar el pre-ARNm DMD de muchos pacientes diferentes de Duchenne e incluso de Becker de manera que se genera una distrofina de fenotipo leve después de la traducción del ARNm reestructurado. La divulgación proporciona así un compuesto particularmente preferido, donde las partes de los compuestos comprenden al menos una primera parte que incluye un oligonucleótido o un equivalente del mismo, complementario al exón 17 y una segunda parte que incluye un oligonucleótido o un equivalente del mismo, complementario al exón 48. El ARNm reestructurado resultante codifica una proteína distrofina acortada dentro del marco de lectura, que carece de todos los exones del 17 al 48. Esta proteína distrofina acortada imita a una distrofina de fenotipo leve tal y como se ha mencionado anteriormente. El compuesto (referido como el compuesto 17-48) debería,

según las bases de datos actuales, ser capaz de tratar cuanto menos al 20% de los pacientes con una mutación de DMD actualmente caracterizada. Otro compuesto preferido es el compuesto 45-55. Este compuesto debería, según los mismos cálculos, ser capaz de tratar al 38% de los pacientes que tienen una mutación de DMD caracterizada hasta ahora. En la divulgación el compuesto comprende un compuesto 42-55 o un compuesto 49-59, capaces de tratar respectivamente al 65% y al 18% de los pacientes de DMD actualmente caracterizados. En la divulgación, el compuesto comprende un compuesto 42-55. Se describe un compuesto 45-49 y un compuesto 45-51 preferiblemente en la forma descrita en la parte experimental, con el potencial para tratar respectivamente al 4% y al 8% de los pacientes de DMD hasta ahora caracterizados. En la divulgación, dicho compuesto comprende un oligonucleótido de la tabla 2 o un equivalente del mismo. Preferiblemente, dicho compuesto comprende al menos dos oligonucleótidos de la tabla 2 o uno o más equivalentes de los mismos. En la divulgación dicho compuesto comprende al menos un oligonucleótido o un equivalente del mismo de la tabla 2, dirigido contra el exón 42 y un oligonucleótido o un equivalente del mismo de la tabla 2, dirigido contra el exón 55. En la divulgación dicho compuesto comprende al menos un oligonucleótido o un equivalente del mismo de la tabla 2, dirigido contra el exón 45 y un oligonucleótido o un equivalente del mismo de la tabla 2, dirigido contra el exón 51.

[0025] También es parte de la divulgación un compuesto capaz de hibridarse con un exón en un pre-ARNm codificado por un gen, comprendiendo dicho compuesto al menos dos partes, donde una primera parte comprende un oligonucleótido del cual al menos una parte de dicho oligonucleótido es complementaria a dicha estructura cerrada y donde una segunda parte comprende un oligonucleótido del cual al menos una parte es complementaria a dicha estructura abierta. Las estructuras cerradas y abiertas son, por supuesto, determinadas a partir de una estructura secundaria de ARN de dicho exón. Preferiblemente un compuesto que tiene dos partes distinguibles complementarias a un único exón, comprende un oligonucleótido o un equivalente del mismo o una combinación de ellos tal y como se ha mencionado anteriormente en el método para generar dicho oligonucleótido.

[0026] La divulgación proporciona adicionalmente una composición que comprende un primer oligonucleótido de la invención, capaz de hibridarse con un exón en un pre-ARNm de un gen o un equivalente de dicho primer oligonucleótido y al menos un segundo oligonucleótido de la divulgación, capaz de hibridarse con otro exón en un pre-ARNm de un gen o un equivalente de dicho segundo oligonucleótido. En la divulgación dicho primer y al menos dicho segundo oligonucleótido o equivalente de los mismos son capaces de hibridarse con exones diferentes en el mismo pre-ARNm. La composición puede utilizarse para inducir el salto de exón de los exones respectivos. Se ha observado que cuando la composición comprende oligonucleótidos o equivalentes de los mismos dirigidos hacia los exones 45 y 51 o 42 y 55 del gen DMD humano, que como excepción a la regla de que sólo los exones escogidos como diana son excluidos del ARNm resultante, en su lugar los exones escogidos y toda región que interviene son excluidos del ARNm resultante. En la presente divulgación esta característica se utiliza para corregir una variedad de diferentes mutaciones debilitantes del gen DMD. De esta forma la divulgación proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que comprende una mutación en el gen DMD humano, donde como resultado de dicha mutación el gen DMD no es apropiadamente traducido en una proteína distrofina funcional, que comprende proporcionar a dicho sujeto una composición tal y como se ha mencionado anteriormente. Las mutaciones que se pueden corregir de esta manera son típicamente mutaciones que se encuentran dentro de o adyacentes al exón escogido o en la región que interviene. No obstante, es también posible corregir mutaciones de desplazamiento de marco que se encuentran más alejadas de los mencionados exones y la región que interviene.

[0027] Un sistema de transcripción que contiene un sistema de empalme puede ser generado *in vitro*. La técnica tiene sistemas disponibles adecuados. No obstante, la necesidad de reestructuración del ARNm, por supuesto, se percibe predominantemente en la manipulación de células vivas. Preferiblemente, las células en las que se puede conseguir un efecto deseado a través de la reestructuración de un ARNm. Los ARNm preferidos que se reestructuran se muestran más arriba. Preferiblemente, en la presente invención se usan genes activos en células musculares. Las células musculares (es decir, miotubos) son células multinucleadas en las que muchos aunque no todos los genes específicos de la célula muscular son transcritos a través de un pre-ARNm largo. Tales pre-ARNm largos son preferidos para la presente divulgación ya que la reestructuración de los ARNm producidos a partir de tales ARNm largos es particularmente eficaz. Se cree, aunque no tiene por qué ser necesariamente así, que el periodo de tiempo relativamente largo que se necesita para generar el pre-ARNm completo ayuda a la eficiencia de reestructuración usando un método o medios de la divulgación, ya que se deja más tiempo al proceso para que continúe. El grupo preferido de genes del cual el ARNm es preferiblemente reestructurado en un método de la invención comprende: COL6A1 causante de la miopatía Bethlem, MTM1 causante de la miopatía miotubular, DYSF (disferlina) causante de la miopatía de Miyoshi y la LGMD, LAMA2 (laminina alfa 2) causante de la distrofia muscular por déficit de merosina, DME (emerina) causante de la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, el gen DMD causante de la distrofia muscular de Duchenne y de la distrofia muscular de Becker y CAPN3 (calpaina) causante de la LGMD2A. Cualquier célula puede ser utilizada, no obstante, tal y como se menciona, se prefiere una célula derivada de un paciente de DMD. Las células se pueden manipular *in vitro*, es decir, fuera del cuerpo del sujeto. No obstante, idealmente las células se proporcionan con capacidad de reestructuración *in vivo*. Los medios adecuados para suministrar células con un oligonucleótido, equivalente o compuesto de la divulgación están presentes en la técnica. Se anticipan mejoras en estas técnicas considerando el progreso que ya ha sido conseguido hasta este momento. Tales mejoras futuras pueden por supuesto ser incorporadas para conseguir el efecto mencionado en la reestructuración del ARNm usando un método de la divulgación. Actualmente los medios adecuados para entregar un oligonucleótido, equivalente o compuesto de la divulgación a una célula *in vivo*, comprenden polietilénimina (PEI) o anfifilos sintéticos (SAINT-18) adecuados para

transfecciones de ácidos nucleicos. Los anfifilos muestran entrega incrementada y toxicidad reducida, también cuando se usan para entrega *in vivo*. Compuestos preferibles se mencionan en (Šmisterová, J., Wagenaar, A., Stuart, M.C.A., Polushkin, E., ten Brinke, G., Hulst, R., Engberts, J.B.F.N., Hoekstra, D., 'Molecular shape of the Cationic Lipid Controls the Structure of the Cationic Lipid/ Dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA Complexes and the Efficiency of Gene Delivery', J. Biol. Chem. 2001, 276, 47615). Los anfifilos sintéticos preferiblemente usados se asientan sobre materiales basados en el grupo del piridinio de "cola larga" fácilmente disponibles sintéticamente. Dentro del gran grupo de anfifilos sintetizados, varios muestran un potencial de transfección destacable combinado con una toxicidad baja en términos de supervivencia celular total. La facilidad de modificación estructural puede utilizarse para permitir modificaciones adicionales y el análisis de sus características adicionales de transferencia de ácidos nucleicos (*in vivo*) y toxicidad.

[0028] Un oligonucleótido, un equivalente del mismo o un compuesto según la divulgación se pueden utilizar para, al menos en parte, alterar la identificación de dicho exón en un pre-ARNm. En la divulgación se puede evitar, al menos en parte, que la maquinaria de empalme una los bordes del exón al ARNm. El oligonucleótido, el equivalente o el compuesto de la divulgación son, al menos en parte, capaces de alterar el reconocimiento de exones en un pre-ARNm. Este uso se proporciona también de este modo en la divulgación. El impedimento a la inclusión de un exón escogido en un ARNm se proporciona también como un uso para estimular, al menos en parte, el salto de exón en un pre-ARNm. Como se ha mencionado anteriormente, el exón escogido no está incluido en el ARNm resultante. No obstante, parte del exón (un neoexón) puede ser retenido ocasionalmente en el ARNm producido. Esto a veces ocurre cuando el exón escogido contiene una secuencia potencial de empalme aceptora y/o donadora. En la divulgación la maquinaria de empalme es redirigida para utilizar una secuencia de empalme aceptora/donadora no usada (o poco usada) previamente, creando así un nuevo exón (neoexón). El neoexón puede tener un extremo en común con el paleoexón, aunque éste no tiene por qué ser siempre el caso. Así, en la divulgación, un oligonucleótido, un equivalente o un compuesto de la invención se utiliza para alterar la eficiencia con la que un donador de empalme o aceptor de empalme es usado por una maquinaria de empalme.

[0029] En vista de lo anterior, la presente divulgación proporciona adicionalmente el uso de un oligonucleótido, un equivalente del mismo o un compuesto de la divulgación para la preparación de un medicamento. Se proporciona además una preparación farmacéutica que comprende un oligonucleótido, un equivalente del mismo o un compuesto según la divulgación. Dicho oligonucleótido, equivalente del mismo o compuesto de la divulgación se puede usar para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad hereditaria. De forma similar se proporciona un método para alterar la eficiencia con la cual un exón en un pre-ARNm es reconocido por una maquinaria de empalme, estando dicho pre-ARNm codificado por un gen que comprende al menos dos exones y al menos un intrón, comprendiendo dicho método el suministro de un sistema de transcripción que comprende dicha maquinaria de empalme y dicho gen, con un oligonucleótido, un equivalente del mismo o un compuesto según la divulgación, donde dicho oligonucleótido, equivalente del mismo o compuesto es capaz de hibridarse al menos con uno de dichos exones y permitir que la transcripción y el empalme ocurran en dicho sistema de transcripción. Preferiblemente, dicho gen comprende al menos 3 exones.

[0030] Un oligonucleótido de la divulgación se puede suministrar a una célula en forma de un vector de expresión donde el vector de expresión codifica un transcrito que comprende dicho oligonucleótido. El vector de expresión se introduce en la célula preferiblemente por medio de un vehículo de entrega de genes. Un vehículo preferido de entrega es un vector viral tal como un vector adenoviral y más preferiblemente un vector viral adenoasociado. La divulgación proporciona también así tales vectores de expresión y vehículos de entrega. Está dentro de la habilidad de la persona cualificada diseñar transcritos adecuados. Se divulgan transcritos conducidos por polimerasa III. Preferiblemente, en forma de un transcrito fusionado con un transcrito U1 o U7. Tales fusiones se pueden generar como se describe en las referencias 53 y 54.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Resultados

[0031] Este estudio incluye 6 pacientes de DMD afectados por diferentes mutaciones (Tabla 1). El paciente DL 515.2 sufre deleción de los exones 45-50; por lo tanto el salto del exón 51 corregiría el marco. El paciente DL 363.2 sufre una deleción de los exones 45-54; el marco de lectura para este paciente se corregiría mediante un salto del exón 44. Para el paciente 50685.1, que es afectado por la deleción del exón 48-50, la corrección del marco de lectura requiere el salto del exón 51. El paciente DL 589.2 sufre una deleción del exón 51-55; el marco de lectura sería corregido mediante un salto del exón 50. El paciente 53914.1 sufre una deleción de un único exón 52. Notablemente, en este caso el salto del exón 51 o exón 53 corregiría el marco. Finalmente, el paciente 50423.1 sufre una deleción de un único par de bases en el exón 49, en la posición 7389 a nivel del ADNc, dando como resultado un desplazamiento de marco y un codón de terminación prematuro en el exón 49. Ya que el exón 49 es un exón dentro del marco de lectura, el salto de este exón corregiría el marco de lectura para este paciente.

[0032] Hemos identificado previamente AON con los cuales se puede inducir el salto de los exones diana mencionados 44, 49, 50, 51 y 53 a concentraciones de 1 μM (23). No obstante, en experimentos dosis-respuesta posteriores hemos

obtenido eficiencias de salto sustanciales con concentraciones más bajas, de 500 nM o 200 nM e incluso 100 nM para la mayoría de AON (datos no mostrados). Esto provocó el efecto favorable extra de requerir dosis inferiores de PEI para la transfección, lo que reducía significativamente los niveles de citotoxicidad, como se encontró en nuestros primeros experimentos de transfección. Cultivos de miotubos de los 6 pacientes de DMD fueron transfectados con los AON pertinentes. En promedio, del 70% al 90% de las células mostraron absorción nuclear específica de AON fluorescentes. El ARN fue aislado durante 24 horas post-transfección y analizado mediante RT-PCR (Fig. 1). En todos los pacientes, los exones escogidos fueron saltados con eficiencias altas y exactamente en los bordes de exón, tal y como se confirma mediante el análisis de secuencias de los nuevos transcritos más cortos (Fig. 1). Para el paciente 50685.1, se encontró un fragmento de transcrito adicional (Fig. 1C). El análisis de secuencias mostró que éste fue generado por la activación de un sitio de empalme críptico en el exón 51. Esto fue también previamente observado en células de control humanas tratadas con el mismo AON (23). Notablemente, se observaron niveles bajos de salto de exón espontáneo en células no tratadas derivadas de los pacientes DL 363.2 (salto del exón 44), DL 589.2 (salto del exón 50) y 53914.1 (salto del exón 53). El análisis RT-PCR en diferentes áreas más grandes del transcrito del gen DMD no ha revelado patrones de empalme adicionales, inesperados o aberrantes inducidos por el tratamiento con AON.

[0033] Los transcritos resultantes dentro del marco deberían restaurar la síntesis de distrofina. De hecho, el análisis inmunohistoquímico de los cultivos de miotubos transfectados detectó distrofina en la mayoría de los miotubos para cada paciente (Fig. 2). La eficiencia terapéutica fue determinada mediante doble tinción, usando anticuerpos contra la miosina para identificar miotubos suficientemente diferenciados y distrofina. En promedio, del 75% al 80% de los miotubos con positivo para miosina mostraron expresión de distrofina. Observamos claramente distrofina ligada a la membrana para los pacientes DL 363.2, DL 589.2 y 53914.1 dos días post-transfección (Fig. 2B, D, E). La presencia de distrofina fue confirmada para cada paciente mediante análisis de western blot (Fig. 3). Para los pacientes 50685.1 y DL 363.2 llevamos a cabo experimentos de curso temporal, que indicaron que la distrofina se puede detectar como pronto 16 horas post-transfección (Fig. 3D) y a niveles crecientes hasta 7 días post-transfección (Fig. 3B). Las proteínas distrofina de los pacientes DL515.2, DL 363.2 y DL 589.2 son significativamente más cortas que las del control humano, lo cual se debe al tamaño de la delección.

[0034] Para un paciente, DL 363.2, también hemos evaluado si la inducción de la síntesis de distrofina resultaba en la restauración de la DGC (Fig. 4). Antes del tratamiento con AON hemos encontrado señales reducidas de alfa-, beta-, gamma-sarcoglicano y beta-distroglicano principalmente citoplasmáticos (30%, 30%, 40% y 80%, respectivamente) (Fig. 4A). A continuación de la transfección con AON, se detectaron niveles aumentados de alfa-, beta-, gamma-sarcoglicano y beta-distroglicano principalmente ligados a la membrana en el 70%, 90%, 90% y 80% de los cultivos de miotubos tratados, respectivamente (Fig. 4B).

35 Discusión

[0035] La estrategia de corrección de marco de lectura para pacientes de DMD se enfoca al salto inducido por antisentidos del exón escogido como diana. Esto convertiría a un fenotipo DMD severo en un fenotipo DMB generalmente más leve. Hemos determinado la amplia aplicabilidad en 6 pacientes, que sufren 5 delecciones diferentes y una mutación puntual en un exón 49 (tabla 1). A continuación del tratamiento con AON, mostramos el salto preciso del exón escogido para cada paciente a nivel de ARN y una proteína de distrofina en el 75% al 80% de los miotubos tratados. En particular, presentamos aquí, por primera vez, la aplicación del tratamiento con un único AON (es decir, el salto inducido de exón 51) para corregir el marco de lectura para diferentes delecciones.

[0036] De manera interesante, los niveles de salto de exón observados en las células del paciente con DMD son significativamente superiores a aquellos previamente obtenidos en las células de control humanas (23). Típicamente, el nuevo transcrito de salto es el producto principal. Esto puede ser explicado por la acción del proceso de degradación mediada por sin sentidos (NMD) (25,32). En las células de control, el salto de un exón fuera del marco produce un transcrito fuera del marco, que será susceptible a la NMD. En las células del paciente, el salto de un exón diana produce un transcrito dentro del marco que sería resistente a la NMD y por tanto más estable que el transcrito fuera del marco originalmente presente.

[0037] Para tres de los pacientes (DL 363.2, DL 589.2 y 53914.1) hemos detectado bajos niveles de salto espontáneo de exones 44, 50 y 53 en células no tratadas. Este fenómeno ha sido también previamente descrito para las llamadas fibras musculares revertantes (33-35). Estas fibras positivas para distrofina están presentes en cantidades bajas (2% a 10%) en músculos con DMD y se considera que son el resultado de mutaciones somáticas secundarias y/o del empalme alternativo que restaura el marco de lectura. Se ha sugerido que la existencia de fibras revertantes está correlacionada con la gravedad de la enfermedad (36,37).

[0038] La restauración de la síntesis de distrofina podría ser detectada como pronto a las 16 horas post-transfección. A los dos días post-transfección, se detectó distrofina en la membrana indicando que estas nuevas proteínas tipo DMB probablemente son funcionales en parte. Es más, mostramos que la restauración de la síntesis de distrofina parece restablecer la formación del complejo de glicoproteína-distrofina.

[0039] En los pacientes DL 363.2 y DL 589.2, el salto del exón escogido extendió las delecciones para abarcar los exones 44-54 y 50-55, respectivamente. Hasta el momento, estas delecciones no se han presentado en pacientes con

DMD o DMB. Esto significa que, o no existen, o generan un fenotipo muy leve no diagnosticado como DMB. Considerando tanto la gran variedad de mutaciones DMB como la incidencia marcadamente inferior de DMB observada, consideramos la última explicación más plausible que la primera. Las deleciones fuera del marco de los pacientes DL 515.1, 50685.1 y 50423.1 se convirtieron en deleciones dentro del marco como se observa en pacientes con DMB portando deleciones de los exones 45-51, los exones 48-51 y el exón 49 (30,38-40). Notablemente, la deleción de los exones 48-51 ha sido descrita incluso en una persona asintomática (40). No obstante, por otro lado, hay también pacientes con DMD portando tales deleciones (38,41-43). Ya que la mayor parte de estas deleciones teóricamente dentro del marco han sido detectadas sólo a nivel del ADN, conjeturamos que la deficiencia de distrofina en estos pacientes con DMD puede ser causada por patrones de empalme aberrante adicionales a nivel del ARN, dando como resultado un transcrito fuera del marco.

[0040] Es viable corregir por encima del 75% de las mutaciones que aparecen en la base de datos sobre mutaciones del DMD en Leiden (30). Nuestros resultados indican que la corrección del marco de lectura inducida por antisentidos será una estrategia terapéutica prometedora para muchos pacientes con DMD sufriendo diferentes deleciones y mutaciones puntuales. Para establecer ensayos clínicos, estamos actualmente indagando y optimizando métodos de entrega en el tejido muscular de ratones *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

AON y cebadores

[0041] Los AON aplicados (tabla 1) se han descrito previamente (23). Éstos contienen un grupo de 5'-fluoresceína (6-FAM), un esqueleto de fosforotioato completo y moléculas de ribosa modificadas con 2'-O-metilo (Eurogentec, Bélgica). Para evitar interferencia con las señales fluorescentes de los anticuerpos secundarios, se usaron AON no marcados para análisis inmunohistoquímicos. Los cebadores para el análisis RT-PCR (secuencias disponibles previa solicitud) fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica) o por Isogen Bioscience BV (Países Bajos).

Cultivos de células miogénicas y transfecciones con AON

[0042] Los mioblastos humanos primarios de los pacientes DL 515.2 (salto de exones 45-50), DL 363.2 (salto de exones 45-54), 50685.1 (salto de exones 48-50), DL 589.2 (salto de exones 51-55) y 53914.1 (salto de exón 52) fueron aislados a partir de una biopsia muscular y cultivados como se describe (44). Los cultivos fueron sembrados en matraces y placas prerrevestidos de colágeno (Vitrogen 100, Cohesion). Los miotubos se obtuvieron de cultivos de mioblasto confluyente, después de 7 a 14 días de privación de suero. Fueron posteriormente modificados usando polietilenimina (PEI) durante 3 horas en un medio bajo en suero, según las instrucciones del fabricante (ExGen500; MBI Fermentas), y con 3.5 µl de PEI aplicados por µg de AON transfectado. Para el análisis RT-PCR se usaron concentraciones de AON de 500 nM. A esta concentración se pueden obtener niveles máximos de salto, pero con niveles moderados de muerte celular. Ya que para análisis inmunohistoquímicos y de western blot se requieren miotubos más viables, se aplicaron concentraciones de 200 nM.

[0043] Para el paciente 50423.1, que sufre una mutación puntual en el exón 49, sólo había disponibles fibroblastos. Después de la infección (MDI 50-100) con un vector adenoviral que contiene el gen MyoD (Ad50MyoD), se forzó la miogénesis de los fibroblastos según los protocolos descritos previamente (45-47). Dos horas post-infección se sustituyó el medio por un medio bajo en suero y las células fueron incubadas durante 8 a 10 días hasta que se formaron los miotubos. Las condiciones de transfección fueron idénticas a las descritas anteriormente.

Aislamiento de ARN y análisis RT-PCR

[0044] A las 24 horas post-transfección, el ARN total fue aislado de los cultivos de miotubos (RNA-Bee, solvente de aislamiento de ARN, Campro Scientific, Países Bajos). Se usaron 300 ng de ARN total para el análisis RT-PCR usando polimerasa C.therm (Roche Diagnostics, Países Bajos) en una reacción de 20 µl a 60 °C durante 30 min, cebada con diferentes cebadores inversos específicos del gen DMD (tabla 1). Se llevaron a cabo PCR primarias mediante 20 ciclos de 94 °C (40 seg), 60 °C (40 seg) y 72 °C (60 seg). Un µl de estas reacciones fue luego reamplificado en PCR anidadas mediante 32 ciclos de 94 °C (40 seg), 60 °C (40 seg) y 72 °C (60 seg). Los productos PCR fueron analizados en geles de agarosa del 1.5% o 2%. Notablemente, no se obtuvo ninguna evidencia de una preferencia significativa por la amplificación de fragmentos más cortos en los análisis PCR en una serie definida de mezclas de cantidades conocidas de los fragmentos de transcrito normal y corto (datos no mostrados).

Análisis de secuencias

[0045] Los productos RT-PCR fueron aislados de los geles de agarosa usando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). La secuenciación directa del ADN fue llevada a cabo por el Leiden Genome Technology Center (LGTC) utilizando el BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) y analizada en un secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems).

Aislamiento de proteínas y análisis de western blot

5 [0046] Se aislaron extractos de proteínas de los cultivos de miotubos tratados (matraces de 25 cm²), usando 150 µl de tampón de tratamiento (75 mM Tris-HCl pH 6.8, 15% de SDS, 5% de β-mercaptoetanol, 2% de glicerol, 0,001% de bromofenol azul), de 2 a 4 días post-transfección dependiendo de la tasa de supervivencia de los miotubos. Para los experimentos de curso temporal, se aislaron extractos de proteína 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas y 48 horas post-transfección (para el paciente 50685.1) o a los 2 días, 4 días y 7 días post-transfección (para el paciente DL 363.2).

10 [0047] La electroforesis en gel de poliacrilamida y el análisis western blot fueron realizados como se describe por Anderson et al, con algunos ajustes menores (48). Brevemente, las muestras (75 µl) fueron dejadas durante toda la noche a 4 °C en un gel de poliacrilamida en gradiente del 4% al 7%. Los geles fueron transferidos a nitrocelulosa durante 5 a 6 horas a 4 °C. Las manchas fueron bloqueadas durante 1 hora con un 5% de leche seca sin grasa en tampón TBST (10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.5% de Tween 20, pH 8) seguido de una incubación durante toda la noche con NCL-DYS2 (que reconoce distrofina) diluido en una proporción 1:50. Se usó HRP conjugado anti-ratón (Santa Cruz) diluido en una proporción 1: 10000 como anticuerpo secundario. Se visualizaron bandas inmunorreactivas utilizando Lumi-Lightplus Western Blotting Substrate y se exploraron con un Lumi-Imager (Roche Diagnostics, Países Bajos).

Análisis inmunohistoquímico

20 [0048] Los cultivos de miotubos tratados fueron fijados en metanol a -20°C de 1 a 4 días post-transfección, dependiendo de la tasa de supervivencia de los miotubos. Antes de la reacción con los diferentes anticuerpos, las células fueron incubadas durante 1 hora en una solución de bloqueo que contiene 5% de suero de caballo (Gibco BRL) y 0.05 % de Tween-20 (Sigma) en PBS (Gibco BRL). Todos los anticuerpos usados fueron diluidos en esta solución de bloqueo. Se aplicaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal de desmina (ICN Biomedicals) diluido en una proporción 1:100, anticuerpo monoclonal de miosina diluido en una proporción 1:100 (MF20; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa), anticuerpo policlonal de miosina L53 diluido en una proporción 1:100 (una donación del Dr. M. van den Hoff, AMC, Países Bajos), MANDYS1 (una donación del Dr G. Morris, North East Wales Institute, Reino Unido) diluido a 1:10 y NCL-DiS2 (Novacastra Laboratories Ltd) diluido en una proporción 1:10 para detectar distrofina, NCL-a-SARC (Novacastra Laboratories Ltd) diluido en una proporción 1:75, NCL-b-SARC (Novacastra Laboratories Ltd) diluido en una proporción 1:50, NCL-g-SARC (Novacastra Laboratories Ltd) diluido en una proporción 1:50 y NCL-b-DG (Novacastra Laboratories Ltd) diluido en una proporción 1:50 para detectar α-sarcoglicano, β-sarcoglicano, γ-sarcoglicano y β-distroglicano, respectivamente. Después de 1 hora de incubación, los portaobjetos se enjuagaron e incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios: conjugado de cabra anti-conejo Alexa Fluor 594 diluido en una proporción 1:1000 o conjugado de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 diluido en una proporción 1:250 (Molecular Probes Inc). Los portaobjetos fueron analizados utilizando un microscopio confocal Leica equipado con óptica de epifluorescencia. Las imágenes digitales fueron capturadas utilizando una cámara CCD (Photometrics).

Ejemplo 2

40 Materiales y métodos

AON y cebadores

45 [0049] Una serie de AON (dos por exón, ver Tabla 2) fue diseñada para enlazarse con secuencias diana internas al exón que muestren un contenido de purina relativamente alto y, preferiblemente, una estructura de pre-ARNm secundario abierta (a 37 °C), de acuerdo a la predicción del servidor RNA mfold versión 3.1 [22]. Los AON variaban en longitud entre 15 y 24 pares de bases, con contenido en G/C entre el 26 y el 67%. Fueron sintetizados con las siguientes modificaciones químicas: un grupo 5'-fluoresceína (6-FAM), un esqueleto de fosforotioato completo y moléculas de ribosa modificadas con 2'-O-metilo (Eurogentec, Bélgica). Los cebadores usados para el análisis de la reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (Tabla 3) fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica) o por Isogen Bioscience BV (Países Bajos).

Experimentos in vitro

55 [0050] Los mioblastos humanos primarios fueron aislados a partir de una biopsia muscular de un individuo no afectado (KM108) por disociación enzimática. Brevemente, el tejido fue homogeneizado en una solución que contenía 5 mg/ml de colagenasa tipo VIII (Sigma), 5 mg/ml de albúmina bovina fracción V (Sigma), 1% de tripsina (Gibco BRL) en PBS (Gibco BRL). Después de pasos de 15 min a 37 °C de incubación en serie, se añadieron y agruparon suspensiones que contenían las células disociadas en un volumen igual al del medio de proliferación (Nut.Mix F-10 (HAM) con GlutaMax-1, Gibco BRL) suplementado con un 20% de suero fetal de bovino (Gibco BRL) y un 1% de una solución de penicilina/estreptomina (Gibco BRL). Después del centrifugado, las células fueron sembradas y adicionalmente cultivadas en un medio de proliferación, usando matraces que fueron prerrevestidos con colágeno dérmico purificado de bovino (Vitrogen 100; Cohesion). El contenido en células miogénicas del cultivo, tal y como se determina por el porcentaje de células positivas de desmina en un ensayo inmunohistoquímico, fue mejorado hasta un 58% por preinoculación repetitiva [23]. Se obtuvieron miotubos a partir de cultivos de mioblastos confluentes después de 7 a 14 días de incubación en un medio bajo en suero (DMEM (Gibco BRL), suplementado con 2% de GlutaMax-1, 1% de

glucosa, 2% de suero fetal de bovino y 1% de una solución de penicilina/estreptomicina). Para la transfección de los cultivos de miotubos, usamos polietilenimina (PEI; ExGen 500) según las instrucciones del fabricante (MBI Fermentas). Los cultivos fueron transfectados durante 3 horas en el medio bajo en suero con 1 mM de cada AON enlazado a PEI en un equivalente de proporción de 3.5.

[0051] Aislamiento del ARN y análisis RT-PCR. A las 24 horas post-transfección, el ARN total fue aislado de los cultivos de miotubos usando RNAzol B según las instrucciones del fabricante (Campro Scientific, Países Bajos). Un microgramo de ARN fue luego usado para análisis RT-PCR usando polimerasa C.therm (Roche Diagnostics) en una reacción de 20 µl a 60 °C durante 30 min, cebada con diferentes cebadores inversos específicos (RT) del gen DMD (tabla 3). Se llevaron a cabo PCR primarias con juegos de cebadores externos (ver tabla 3), durante 20 ciclos a 94 °C (40 s), 60 °C (40 s) y 72 °C (90 s). Un microlitro de esta reacción fue luego reamplificado en PCR anidadas utilizando las combinaciones de cebadores apropiadas (tabla 3) durante 32 ciclos a 94 °C (40 s), 60 °C (40 s) y 72 °C (60 s). Los productos PCR fueron analizados en geles de agarosa del 1.5 o 2%.

[0052] Los productos RT-PCR de análisis de secuencias fueron aislados de los geles de agarosa utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). La secuenciación directa del ADN fue llevada a cabo por el Leiden Genome Technology Center (LGTC) utilizando el BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) y analizada en un secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems).

Resultados

Salto de exón *in vitro*

[0053] Los AON fueron empíricamente analizados para la inducción de salto de exón después de la transfección en cultivos de miotubos humanos de control, usando el polímero catiónico de polietilenimina (PEI). Tal y como se determina por la absorción nuclear de AON fluorescentes, se obtuvieron eficiencias promedio de transfección del 60-80%. A las 24 horas post-transfección, se analizaron transcritos mediante RT-PCR usando diferentes combinaciones de cebadores que abarcan los exones escogidos (Tabla 3). De los 30 AON probados, un total de 21 (el 70%) generó con reproducibilidad fragmentos más cortos con tamaños correspondientes al salto específico de los exones escogidos (Fig. 5 y tabla 2). De hecho, como se confirma mediante el análisis de secuencias de los transcritos más cortos (datos no mostrados), podríamos inducir el salto específico de 13 de los 15 exones escogidos (cinco de los siete exones dentro del marco y ocho de ocho exones fuera del marco). No se detectó ningún salto de los exones 47 y 48 (Fig. 5e, g).

[0054] En las regiones de transcritos específicos que fueron seleccionadas en estos experimentos, observamos patrones de empalme alternativos en los miotubos de control no transfectados alrededor de los exones 2 y 29 (Fig. 5b,c). Los productos alternativos fueron secuenciados y se encontró que eran debidos al salto de los exones 2-7 (dentro del marco), exones 3-7 (fuera del marco), exones 28-29 (dentro del marco) y exones 27-29 (dentro del marco). Estos saltos de exón, que realmente ocurren, fueron también detectados previamente en el músculo esquelético humano [24,25]. Notablemente, el nivel de empalme alternativo fue mejorado significativamente por el tratamiento con AON de los cultivos de miotubos transfectados. También es remarcable la observación de que el h2AON1 no sólo inducía el salto de exón 2 en el transcrito normal, sino también en uno de los transcritos alternativos que consisten en los exones 1 y 2 empalmados al exón 8 (Fig. 5b).

[0055] La mayoría de AON inducía el salto preciso de los exones escogidos, usando los sitios originales de empalme de los exones adyacentes. No obstante, en respuesta a h51AON2, un sitio de empalme críptico dentro del marco se usó en el exón 51 (Fig. 5h). El nivel de este producto empalmado de manera alternativa era variable en los experimentos de transfección en serie. Finalmente, en algunos de los experimentos de transfección, fragmentos de empalme aberrante adicionales fueron detectados debido al salto de exones adyacentes. Su incidencia, no obstante, fue inconsistente y con niveles muy bajos.

[0056] Referencias para el ejemplo 2 (la numeración en esta parte se refiere estrictamente a la numeración mantenida en el ejemplo 2)

[1] Hoffman EP, Brown Jr RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 1987;51:919-928.

[2] Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. Genomics 1988;2:90-95.

[3] Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. Am J Hum Genet 1989;45:498-506.

[4] Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, et al. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. Nature 1988;333:466-469.

[5] Yoshida M, Ozawa E. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. J Biochem (Tokyo) 1990;108:748-752.

[6] Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophinglycoprotein complex. Cell 1991;66:1121-1131.

[7] Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988;53:219-226.

[8] van Deutekom JC, Floyd SS, Booth DK, et al. Implications of maturation for viral gene delivery to skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 1998;8:135-148.

5 [9] Mayeda A, Hayase Y, Inoue H, Ohtsuka E, Ohshima Y. Surveying cis-acting sequences of pre-mRNA by adding antisense 20-O-methyl oligoribonucleotides to a splicing reaction. *J Biochem (Tokyo)* 1990; 108:399-405.

[10] Galderisi U, Cascino A, Giordano A. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J Cell Physiol* 1999; 181: 251-257.

10 [11] Baker BF, Monia BP. Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489:3-18.

[12] Kole R, Sazani P. Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing. *Curr Opin Mol Ther* 2001;3:229-234.

[13] Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989;244:1578-1580.

15 [14] Dunkley MG, Manoharan M, Villiet P, Eperon IC, Dickson G. Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum Mol Genet* 1998;7:1083-1090.

[15] Mann CJ, Honeyman K, Cheng AJ, et al. Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:42-47.

20 [16] Wilton SD, Lloyd F, Carville K, et al. Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using anti-sense oligonucleotides. *Neuromuscul Disord* 1999;9:330-338.

[17] Takeshima Y, Wada H, Yagi M, et al. Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. *Brain Dev* 2001;23:788-790.

25 [18] Pramono ZA, Takeshima Y, Alimsardjono H, Ishii A, Takeda S, Matsuo M. Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:445-449.

[19] Watakabe A, Tanaka K, Shimura Y. The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev* 1993;7:407-418.

[20] Tanaka K, Watakabe A, Shimura Y. Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing enhancer. *Mol Cell Biol* 1994;14:1347-1354.

30 [21] van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, et al. Antisenseinduced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001;10:1547-1554.

[22] Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999;288:911-940.

35 [23] Richler C, Yaffe D. The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol* 1970;23: 1-22.

[24] Surono A, Takeshima Y, Wibawa T, Pramono ZA, Matsuo M. Six novel transcripts that remove a huge intron ranging from 250 to 800 kb are produced by alternative splicing of the 50 region of the dystrophin gene in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:895-899.

40 [25] Shiga N, Takeshima Y, Sakamoto H, et al. Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1997;100:2204-2210.

[26] Wells DJ, Wells KE, Asante EA, et al. Expression of human fulllength and minidystrophin in transgenic mdx mice: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1995;4:1245-1250.

45 [27] Sironi M, Pozzoli U, Cagliani R, Comi GP, Bardoni A, Bresolin N. Analysis of splicing parameters in the dystrophin gene: relevance for physiological and pathogenetic splicing mechanisms. *Hum Genet* 2001;109:73-84 . A. Aartsma-Rus et al. / *Neuromuscular Disorders* 12 (2002) S71-S77.

Ejemplo 3

50 Resultados

Salto de doble exón en dos pacientes con DMD

[0057] Este estudio incluye dos pacientes con DMD afectados por mutaciones diferentes de interrupción del marco en el gen DMD que requieren el salto de dos exones para la corrección del marco de lectura (tabla 5). El paciente DL 90.3 sufre una mutación sin sentido en el exón 43. Considerando que este único exón está fuera del marco, el salto de exón 43 eliminaría la mutación sin sentido pero no restauraría el marco de lectura. Como la combinación con el exón 44 está dentro del marco, teníamos como objetivo en este paciente el salto de doble exón, dirigido a estos dos exones. El paciente DL 470.2 está afectado por una delección de los exones 46 a 50. La restauración del marco requeriría un salto de doble exón de los dos exones que flanquean la delección. Los cultivos de miotubos de ambos pacientes fueron transfectados con una mezcla de AON específicos de los exones 43 y 44 (DL90.3) o AON específicos de los exones 45 y 51 (DL470.2). Los AON individuales (tabla 5) fueron previamente muy eficaces en el salto de un único exón. Las eficiencias de transfección fueron típicamente de más del 80%, como indica el número de células con absorción nuclear específica de los AON fluorescentes. El análisis RT-PCR a las 24 a 48 horas post-transfección, ha demostrado de hecho la viabilidad de salto de doble exón específico en ambas muestras (Fig 6 y 7). Esto fue confirmado por el análisis de secuencias (datos no mostrados). Fragmentos más cortos de transcrito adicionales fueron obtenidos debido al salto

de un único exón: en el paciente DL 90.3 salto del exón 44 (Fig.6) y en el paciente DL470.2 salto del exón 51 (Fig.7).

Salto de multi-exón

5 [0058] El empalme del exón 44 directamente con el exón 52 (como el inducido en DL470.2) genera un transcrito dentro del marco. Hemos conjeturado que induciendo el salto del tramo entero de exones entre ellos, es decir, un salto de multi-exón, induciríamos una delección tipo DMB (45-51) que abarque y restaure diferentes mutaciones de DMD conocidas más pequeñas. Esto ampliaría aún más el grupo de pacientes con DMD que se beneficiarían de un tipo de corrección del marco. La viabilidad de salto de multi-exón se mostró primero en miotubos humanos de control que fueron tratados con una mezcla de AON específicos de los exones 45 y 51 (Fig. 7; KM 109). Luego aplicamos ésta a miotubos de un tercer paciente con DMD que sufre una delección de los exones 48-50 (50685.1). Mediante el salto inducido por los AON de los (restantes) tramos de exones entre ellos, e incluyendo los exones 45 y 51, obtuvimos el transcrito dentro del marco más pequeño que anticipábamos, con el exón 44 empalmado con el exón 52 (Fig.7).

15 Salto de doble- y multi-exón usando una combinación de AON con unión U

[0059] El salto de más de un exón en una molécula de pre-ARNm requiere que ambos AON están presentes en el mismo núcleo, dirigiéndose a la misma molécula. Para ampliar esta posibilidad, hemos estudiado aquí la viabilidad de un AON combinado que tiene ambos AON específicos para los exones 45 y 51 (h45AON5 y h51AON2) enlazados por 10 nucleótidos de uracilo (Tabla 5). Después de la transfección de este "AON de unión U" en miotubos humanos de control y en los pacientes con DMD DL470.2 y 50685.1, el análisis RT-PCR demostró su eficacia para generar el transcrito dentro del marco anticipado con el exón 44 empalmado al exón 52 (Fig.7). Este salto de multi-exón ocurrió específicamente y exactamente en los bordes de exón como se confirma mediante el análisis de secuencias (datos no mostrados). En contraste con el paciente DL 470.2, el AON de unión U fue ligeramente más eficaz que la mezcla de AON en el control humano y en el paciente 50685.1.

MATERIAL Y MÉTODOS

AON y cebadores

30 [0060] Los AON (Tabla 5) que se dirigen a los exones 43, 44 y 51 se habían descrito previamente [Aartsma-Rus, 2002]. Los AON que se dirigen al exón 45 han sido recientemente diseñados (secuencias previa solicitud). Todos los AON contienen un grupo 5'-fluoresceína (6-FAM), un esqueleto de fosforotioato completo y moléculas de ribosa modificadas con 2'-O-metilo (Eurogentec, Bélgica). Para evitar interferencia con las señales fluorescentes de los anticuerpos secundarios, se usaron AON no marcados para análisis inmunohistoquímicos. Los cebadores para análisis RT-PCR (Tabla 5, secuencias disponibles previa solicitud) fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica).

Aislamiento de ARN y análisis RT-PCR

40 [0061] A las 24 a 48 h post-transfección, el ARN total fue aislado de los cultivos de miotubos (RNA-Bee, solvente de aislamiento de ARN, Campro Scientific, Países Bajos). Se usaron 300 ng de ARN total para el análisis RT-PCR usando polimerasa C.therm (Roche Diagnostics, Países Bajos) en una reacción de 20 µl a 60 °C durante 30 min, cebada con diferentes cebadores inversos específicos del gen DMD (Tabla 5). Se llevaron a cabo PCR primarias mediante 20 ciclos de 94 °C (40 seg), 60 °C (40 seg) y 72 °C (60 seg). Un µl de estas reacciones fue luego reamplificado en PCR anidadas mediante 32 ciclos de 94 °C (40 seg), 60 °C (40 seg) y 72 °C (60 seg). Los productos PCR fueron analizados en geles de agarosa del 1.5% o 2%. Para la cuantificación de los productos transcritos, se realizaron PCR anidadas utilizando 24 ciclos. Los productos PCR fueron analizados utilizando el DNA 7500 LabChip® Kit y el Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Países Bajos).

Análisis de secuencias

50 [0062] Los productos RT-PCR fueron aislados de los geles de agarosa usando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). La secuenciación directa del ADN fue llevada a cabo por el Leiden Genome Technology Center (LGTC) utilizando el BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) y analizada en un secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems).

Ejemplo 4.

60 Vectores de expresión que codifican un transcrito que comprende un oligonucleótido de la invención.

[0063] Debido a la tasa de producción definida del pre-ARNm de distrofina y de los AON, nuestra terapia de corrección del marco del DMD requeriría la administración repetitiva de AON. Además, los niveles relativamente altos de ARN antisentido serán necesarios dentro del núcleo, donde ocurre la transcripción y el empalme del pre-ARNm de distrofina. Por lo tanto, hemos preparado un sistema de vectores en el que secuencias específicas de AON se incorporan a un gen modificado. En este ejemplo esta realización es descrita para ARN pequeño nuclear U7 (ARNpn U7). El ARNpn U7 es el componente de ARN de la partícula de ribonucleoproteína U7 (RNPpn U7) implicada en el procesamiento del extremo

3' del pre-ARNm de histona. Inherente a su función, la RNPp_n U7 se transporta eficazmente de vuelta desde el citoplasma al núcleo en el que posteriormente es incorporada a complejos de ARNp_n U7 muy estables. Una estrategia similar se aplicó con éxito en estudios de terapia génica basados en AON en β -talasemia (53,54). En estos estudios, diferentes plásmidos fueron creados conteniendo un gen ARNp_n U7 modificado del cual se reemplazó la secuencia antisentido natural dirigida al pre-ARNm de histona con secuencias antisentido dirigidas a sitios de empalme aberrantes asociados a la β -talasemia en el gen de la β -globina. Después de la transfección de estos plásmidos, el empalme y expresión correctos de la proteína β -globina completa pudieron ser restaurados con una eficiencia de hasta el 65% en células cultivadas que expresaban diferentes genes mutantes de la β -globina.

[0064] Hemos creado genéticamente varios constructos génicos de ARNp_n U7 tal y como se describe en la referencia 53 con la modificación de que las secuencias de β -globina fueron exactamente reemplazadas por las secuencias antisentido derivadas de los diferentes AON. En este ejemplo, las secuencias fueron reemplazadas por las secuencias antisentido de m46AON4, 6, 9 o 11 que fueron efectivas en la inducción del salto del exón 46 de ratón. Un constructo sentido fue incluido como control negativo (m46SON6). Después de la validación del constructo mediante secuenciación, los plásmidos fueron probados *in vitro* mediante transfección en cultivos de mioblastos C2C12 de ratón. El constructo ARNp_n U7-m46AON6 fue el más eficaz.

[0065] Para mejorar la entrega de los constructos génicos de AON-ARNp_n U7, los hemos clonado en vectores virales adenoasociados recombinantes (VAAr). El VAA es un parvovirus de ADN monocatenario que no es patógeno y muestra un ciclo de vida dependiente. En contraste con otros virus (adenovirus, retrovirus y virus del herpes simple), los vectores VAAr han demostrado ser muy eficaces en la transducción del músculo esquelético maduro. Mientras que la aplicación de VAAr en los estudios clásicos de "adición de genes" DND ha sido obstaculizada por sus restringidos límites de empaquetamiento (< 5 kb), aplicamos VAAr para la entrega eficaz de los constructos antisentido mucho más pequeños (< 600 pares de bases) de ARNp_n en el músculo esquelético murino maduro.

[0066] El constructo U7-m46AON6 fue más eficaz en la inducción de salto del exón 46 después de la transfección en miotubos C2C12 de ratón, y fue clonado como un fragmento de NotI en un vector VAAr (Stratagene). Este vector contiene el gen para proteína verde fluorescente (GFP-cDNA) clonado entre secuencias ITR derivadas de VAA. La proteína GFP permite determinar las eficiencias de transducción en el músculo, post-infección. Hemos creado varios vectores, con el constructo de AON-U7, tanto sólo como distal y proximal al gen de GFP. Los vectores fueron validados por su contenido de inserción mediante análisis de secuencias. Para la producción de virus VAAr, co-transfectamos 293 células con los plásmidos de U7-AON-VAAr en combinación con el plásmido de empaquetamiento/auxiliar, pDP-5. Este es un plásmido auxiliar mejorado, que contiene todas secuencias VAA y adenovirales y requeridas para la amplificación y empaquetamiento de vectores VAA. El plásmido pDP-5, obtenido del Dr. J. Kleinschmidt (dkfz Heidelberg, Alemania), facilita la producción de altas concentraciones de hasta 10^{12} partículas víricas/ml de VAAr infeccioso y sin contaminación de adenovirus o VAA de tipo salvaje. Después de la purificación y la concentración, evaluamos posteriormente dos constructos, VAAr-U7m46AON6 y VAAr-GFP-U7m46AON6, infectando miotubos C2C12 de ratón a dos MDIs (multiplicidades de infección) diferentes. A los 7 días post-infección, el ARN fue aislado y se realizó el análisis RT-PCR (como se describe en MATERIAL Y MÉTODOS). El constructo VAAr-m46AON6 fue el más eficaz e indujo salto del exón 46 a niveles de ~20% (ver Figura 17).

Ejemplo 5

Título:

Salto de doble y multi -exón.

[0067] Usando una combinación de AON, fue inducido el salto de doble exón 43 y 44, y se restauró la síntesis de distrofina en los miotubos de un paciente afectado por una mutación sin sentido en el exón 43. Para otro paciente, con una delección de exón 46-50, se consiguió el salto terapéutico del doble exón 45 y 51. Notablemente, en los miotubos de control, ésta última combinación de AON causaba el salto del tramo entero de los exones 45 a 51. Este salto de multi-exón dentro del marco sería terapéutico para una serie de pacientes con diferentes mutaciones causantes de DMD. De hecho, aquí demostramos su viabilidad en los miotubos de un paciente con una delección en el exón 48-50. La aplicación de salto de multi-exón proporciona una metodología más uniforme para un grupo más grande de pacientes con DMD.

[0068] Los AON se han convertido recientemente en una herramienta atractiva para el estudio y tratamiento de enfermedades humanas. Inicialmente, los AON se usaron para la inhibición específica de secuencias de genes, tanto para dilucidar procesos de desarrollo como para suprimir la expresión génica maligna o aberrante (Dennis et al. 1998 Stevenson et al. 1999 Nasevicius y Ekker 2000 Corey y Abrams 2001 Dove 2002). En estos estudios, los AON mediaron en la degradación por RNasa H de ARN bicatenario, o bloquearon el inicio de la transcripción o la traducción. No obstante, los AON son también capaces de modular el empalme de pre-ARNm (Sierakowska et al. 1996). Ya que ha sido estimado que al menos el 15% de las mutaciones puntuales causantes de enfermedades resultan en defectos de empalme del ARN (Krawczak et al. 1992 Cartegniet al. 2002 Buratti et al. 2003), esta última aplicación puede ser altamente relevante para terapias genéticas futuras. Por ejemplo, los AON resistentes a RNasa H han sido usados con éxito para inducir el salto de pseudo-exones, bloqueando sitios de empalme críptico en el gen de la β -globina

(Sierakowska et al. 1996) y el gen regulador de la conductancia de transmembrana en fibrosis quística (Friedman et al. 1999). Alternativamente, los AON unidos a 10 repeticiones de dipéptido de arginina-serina para el reclutamiento artificial de factores potenciadores de empalme han sido aplicados *in vitro* para inducir la inclusión de los exones mutados *BRCA1* y *SMN2* que de otra forma serían saltados (Cartegni y Krainer 2003). Los AON también han sido eficaces para 5 alterar la proporción de empalme alternativo, lo cual fue aplicado para genes relacionados con el cáncer para dirigir isoformas malignas hacia no malignas (Mercatante et al. 2001,2002). Por último, pero no menos importante, una prometedora aplicación, recientemente desarrollada de AON es inducir el salto específico de exones para corregir el marco de lectura de un transcrito mutado de modo que se pueda traducir en una proteína parcialmente funcional. El gen *DMD*, que codifica la distrofina, es muy adecuado para ésta última aplicación. La proteína consiste en un dominio N- 10 terminal que enlaza con filamentos de actina, un dominio de barra central y un dominio C-terminal rico en cisteína que enlaza con el complejo de glicoproteína distrofina (Hoffman et al. 1987 Koenig et al. 1988 Yoshida y Ozawa 1990). Las mutaciones en el gen *DMD* que interrumpen el marco de lectura resultan en una pérdida completa de la función de distrofina, que causa la distrofia muscular de Duchenne severa (DMD [MIM 310200]) (Hoffman et al. 1988 et al. 1989 Ervasti et al. 1990). La más leve distrofia muscular de Becker (DMB [MIM 300376]), por otro lado, es el resultado de mutaciones en el mismo gen que no desplazan el marco y resultan en una distrofina suprimida internamente pero 15 parcialmente funcional que ha retenido sus extremos N-terminal y C-terminal (Koenig et al. 1989; Di Blasi et al. 1996). Más de dos tercios de los pacientes con DMD y DMB sufren una delección de uno o más exones (den Dunnen et al. 1989). Notablemente, se han descrito pacientes que muestran DMB muy leve y de los cuales hasta un 67% carecen del dominio de barra central (England et al. 1990; Winnard et al. 1993; Mirabella et al. 1998). Esto sugiere que, a pesar de 20 delecciones grandes, una distrofina parcialmente funcional puede ser generada, a condición de que las delecciones traduzcan el transcrito en el marco. Los AON para alterar el empalme de modo que el marco de lectura abierto se restaure y el fenotipo DMD severo se convierta en un fenotipo DMB más leve. Diferentes estudios han mostrado saltos terapéuticos de un único exón inducido por AON en células obtenidos del modelo de ratón *mdx* (Dunckley et al. 1998; Wilton et al. 1999; Mann et al. 2001,2002; Lu et al. 2003) y varios pacientes DMD (Takeshima et al. 2001 van Deutekom et al. 2001 Aartsma-Rus et al. 2002,2003; De Angelis et al. 2002). Hasta la fecha, hemos identificado una serie de AON 25 que puede utilizarse para inducir el salto de 20 exones diferentes (exones 2, 8,17, 19, 29,40-46,48-53, 55, y 59) (Aartsma-Rus et al. 2002). De todos los pacientes con DMD, más del 75% se beneficiarían del salto de estos exones. Hasta el momento, hemos aplicado con éxito el salto de un único exón en células derivadas de ocho pacientes diferentes con DMD (van Deutekom et al. 2001; Aartsma-Rus et al. 2003). En estos estudios, el salto de exones 30 flanqueando delecciones fuera del marco o un exón dentro del marco que contiene un mutación sin sentido restauraron el marco de lectura e introdujeron la síntesis de distrofinas tipo DMB en aproximadamente del 75% al 80% de las células tratadas. Estas distrofinas nuevas podrían ser detectadas como pronto 16 horas después de la transfección; las distrofinas se incrementaron a niveles significativos antes de los 4 días y se mantuvieron al menos durante 7 días (Aartsma-Rus et al. 2003). Aquí, extendemos significativamente la aplicabilidad terapéutica demostrando el salto doble 35 y multi-exón (fig. 8). Después del salto simultáneo de dos exones (salto de doble exón), el marco de lectura fue restaurado para un paciente con una mutación sin sentido en un exón fuera del marco y para otro paciente con una delección que no podía ser evitada mediante el salto de un solo exón. Es más, a través del salto de un tramo entero de exones consecutivos (salto de multi-exón), se generó una delección tipo DMB para restaurar hasta el 14% de todas las mutaciones de DMD conocidas.

40 MATERIAL Y MÉTODOS

AON y cebadores

45 [0069] Los AON internos al exón dirigidos a los exones 44 (h44AON1) y 51 (h51AON2) se han descrito en otro lugar (Aartsma-Rus et al. 2002). Los AON dirigidos a los exones 43 y 45 fueron específicamente diseñados para este estudio (h43AON5: CUGUAGCUUCACCCUUUCC; h45AON5: GCCCAAUGCCAUCUGG). El análisis con BLAST de AON no reveló homología perfecta a otras secuencias en el genoma humano (homología máxima 94%, valor de *E* mínimo 0.3). Todos los AON contienen un grupo 5'-fluoresceína (6-FAM), un esqueleto de fosforotioato completo y moléculas de 50 ribosa modificadas con 2'-O-metilo (Eurogentec). Para evitar interferencia con las señales fluorescentes de los anticuerpos secundarios, se usaron AON no marcados para análisis inmunohistoquímicos. Los cebadores para análisis RT-PCR (fig. 8) fueron sintetizados por Eurogentec (secuencias disponibles previa solicitud).

55 Cultivos Celulares Miogénicos y transfecciones AOIV

[0070] Los mioblastos primarios de un control humano y de dos pacientes con DMD (DL470.2 [delección de exones 46-50] y 50685.1 [delección de exones 48-50]) fueron aislados a partir de una biopsia muscular y cultivados como se describe en otro lugar (Aartsma-Rus et al. 2002). Los miotubos fueron obtenidos de cultivos de mioblastos confluentes, después de 7 a 14 días de privación de suero. Estos fueron transfectados con mezclas de 200 nM de cada AON. Se usó polietilenamina (PEI) como reactivo de transfección, según las instrucciones del fabricante (ExGen 500 [Fermentas]). Se hicieron diluciones separadas de AON-PEI para cada AON, con 3.5 µl de PEI aplicado por µg de AON transfectado. Para el paciente DL90.3, que tiene una mutación puntual en el exón 43, sólo los fibroblastos estaban disponibles. Después de ser infectados (multiplicidad de infección [MDI] 50-100) con un vector adenoviral que contiene el gen *MyoD* (Ad50MyoD), se forzó la miogénesis en los fibroblastos, según protocolos descritos en otro lugar (Murry et al. 1996 65 Roest et al. 1996; Aartsma-Rus et al. 2002; Havenga et al. 2002). Las condiciones de transfección fueron idénticas a las descritas anteriormente.

Aislamiento de ARN y análisis RT-PCR de los productos de salto

[0071] Aislamiento del ARN, RT-PCR y análisis de secuencias fueron llevados a cabo como se describe en otro lugar (Aartsma-Rus et al. 2002). Ver Figura 8 para la ubicación de los cebadores. Para la cuantificación de los productos de salto, se realizaron PCR anidadas usando 24 ciclos. Los productos PCR fueron analizados utilizando el DNA 1000 LabChip Kit y el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Para analizar el empalme del gen *DMD* completo, se llevaron a cabo reacciones RT con 1 µg de ARN, cebadores de hexámeros aleatorios y SuperScript III (Invitrogen). Se realizaron análisis PCR utilizando los cebadores del test proteína truncada (PTT) descritos en otro lugar (Roest et al. 1993). Ya que algunos de los cebadores PCR fueron localizados en exones que se suprimieron para el paciente DL470.2, diseñamos específicamente cebadores adicionales en los exones 41, 42, 45, 53, y 54 (secuencias disponibles previa solicitud).

Análisis de la proteína distrofina

[0072] Análisis inmunohistoquímicos y western blot fueron realizados como se describe en otro lugar (Aartsma-Rus et al. 2002). El anticuerpo policlonal de miosina L53 (una donación del Dr. M. van den Hoff, Amsterdam Medical Center, Países Bajos) fue usado para detectar miosina. MANDYS1 (una donación del Dr G. Mauricio, North East Wales Institute, Reino Unido), NCL-DYS2 (Novacastra Laboratories) y NCL-DiS1 (Novacastra Laboratories) fueron usados para detectar distrofina. Para el análisis western blot, los niveles de distrofina fueron cuantificados utilizando LumiAnalyst 3.0 (Roche).

Resultados

Salto de doble exón en dos pacientes con DMD

[0073] El salto de un exón no es suficiente para restaurar el marco de lectura para cada mutación. En una fracción significativa de las mutaciones, es preciso saltar dos exones simultáneamente (fig. 8A). Por ejemplo, el paciente DL90.3 sufre una mutación sin sentido en el exón 43. Considerando que este único exón está fuera del marco, el salto de exón 43 elimina la mutación sin sentido pero no restaura el marco de lectura. Ya que la combinación de exones 43 y 44 está en el marco, tenemos como objetivo el salto simultáneo de ambos exones. El paciente DL470.2 sufre una delección de los exones 46-50. La restauración del marco requiere el salto conjunto de los dos exones que flanquean la delección (fig. 8A). Los cultivos de miotubos de estos pacientes fueron transfectados con una mezcla tanto de AON específicos de los exones 43 y 44 (paciente DL90.3) como de AON específicos de los exones 45 y 51 (paciente DL470.2). Las eficiencias de transfección fueron típicamente de más del 80%, como indica el número de células con absorción nuclear específica de AON fluorescentes. El análisis RT-PCR a las 24 a 48 horas post-transfección, ha demostrado, de hecho, la viabilidad de salto de doble exón específico en ambos pacientes (30% y 75% del total de fragmentos de transcrito para los pacientes DL90.3 y DL470.2, respectivamente), lo cual fue confirmado por el análisis de secuencias (figuras 9A y 10A). Tal como se esperaba, además del salto de doble exón, también detectamos salto de un único exón en el paciente DL90.3 (exón 44, el 27% de los transcritos totales) y el paciente DL470.2 (exón 51, el 12% de los transcritos totales). Para verificar que ninguna región del transcrito *DMD* más grande o de otro tipo fue afectada por los tratamientos con AON, hemos llevado a cabo análisis RT-PCR en todo el gen *DMD*, con grupos consecutivos de exones. Tanto en los miotubos tratados como en los no tratados, no hemos detectado patrones de empalme aberrante adicionales en el gen *DMD* (fig. 11). El análisis inmunohistoquímico usando dos anticuerpos diferentes dirigidos contra la parte interna (MANDYS1) y C-terminal (Dys2) de la distrofina mostró que los transcritos dentro del marco, obtenidos de salto de doble exón, producían distrofinas tipo DMB. En promedio, el 70% de los miotubos positivos para miosina mostraban la expresión de distrofina en respuesta a la transfección de AON (figuras 9B y 10B). El análisis Western blot confirmó la presencia de distrofina para el paciente DL90.3 (después de 4 días) y el paciente DL470.2 (después de 2 días), a niveles del 3.3% y 1.8% respectivamente, en comparación con los miotubos de control (figuras 9C y 10C).

Salto de multi-exón

[0074] El empalme del exón 44 directamente al exón 52 (tal y como se indujo en el paciente DL470.2) genera un transcrito dentro del marco de lectura. Inducir el salto de este tramo de exones completo – esto es, salto de multi-exón – generaría una delección tipo DMB (exones 45-51) abarcando un rango de mutaciones de *DMD* internas, más pequeñas. (fig. 8B). El salto de multi-exón fue primero probado en miotubos humanos de control (individuo KM109) tratados con una mezcla de 200 nM de ambos AON específicos de los exones 45 y 51 (fig. 12A). Observamos un nuevo transcrito, más corto, correspondiente a un tamaño que resultaría del salto escogido de los exones 45-51. De hecho, el análisis de secuencias reveló que el exón 44 se empalmó directamente al exón 52 (datos no mostrados). Después lo aplicamos a miotubos obtenidos de un paciente con DMD (50685.1) que sufre una delección de los exones 48-50 (fig. 8B). El salto inducido por AON de todos los exones del 45 al 51 produjo el transcrito dentro del marco de lectura que se buscaba (fig. 12A).

Salto de multi y doble exón usando una combinación de AON con unión U

[0075] El salto de más de un exón de una molécula de pre-ARNm requiere que ambos AON estén presentes en el mismo núcleo, dirigiéndose a la misma molécula. Para mejorar específicamente esta probabilidad, hemos diseñado un AON combinado que contiene tanto el exón 45 como el 51 (h45AON5 y h51AON2), unidos por 10 nucleótidos de uracilo

(fig. 12B). Después de la transfección de este "AON de unión U" en miotubos humanos de control (individuo KM109) y de los dos pacientes con DMD (DL470.2 y 50685.1), el análisis RT-PCR demostró su eficacia para generar el transcrito dentro del marco con el exón 44 empalmado al exón 52 (fig. 12A). Este salto de multi-exón ocurrió específicamente y exactamente en los bordes de exón, como confirma el análisis de secuencias (datos no mostrados). La cuantificación
5 mostró que el AON de unión U fue más eficaz que la mezcla de AON en los miotubos del paciente 50685.1 y del control humano pero no en los miotubos del paciente DL470.2 (fig. 12C).

Discusión

10 [0076] El salto inducido de un único exón ha mostrado potencial terapéutico para corregir el marco de lectura e inducir la síntesis de distrofina tipo DMB en células musculares cultivadas de pacientes con DMD (Takeshima et al. 2001; van Deutekom et al. 2001; De Angelis et al. 2002; Aarstma-Rus et al. 2003). Aquí, demostramos la viabilidad del salto de multi-exón inducido por antisentidos para uso terapéutico. El salto espontáneo de múltiples exones ocurre
15 frecuentemente en la naturaleza, aunque a niveles bajos. Este ha sido detectado tanto en pacientes con DMD como en individuos no afectados (Sironi et al. 2002). Es más, se ha sugerido que este fenómeno es el mecanismo subyacente de la aparición de fibras "revertantes" positivas en distrofina en el modelo de ratón *mdx* y en pacientes con DMD (Sherratt et al. 1993; Thanh et al. 1995; Lu et al. 2000). El salto de multi-exón ha sido observado también en estudios de terapia génica DMD centrados en el salto escogido del exón mutado 23 en células musculares de ratones *mdx* (Dunckley et al. 1998; Wilton et al. 1999; Bertoni et al. 2003). Tanto AON como oligonucleótidos de ADN-ARN quimérico dirigidos al extremo de empalme 3' de este exón generaron transcritos dentro del marco o fuera del marco más cortos, en los que se saltaron exones adicionales adyacentes al exón 23. En este estudio, nos centramos específicamente en inducir el salto de multi-exón. Usando combinaciones de AON, el salto doble de los exones 43-44 y 45-51 fue inducido en los cultivos de miotubos obtenidos de pacientes. El análisis inmunohistoquímico de miotubos individuales indicó que esto permitió la síntesis de distrofinas hasta en un 70% de los miotubos. Este porcentaje no es significativamente inferior a aquellos obtenidos en nuestros estudios previos de salto de un único exón (75%-80%) (Aarstma-Rus et al. 2003). Esto sugiere que tanto la transfección como el rendimiento de salto de dos AON simultáneamente no son significativamente menos eficaces que las de un único AON. No obstante, en un número de los restantes miotubos negativos para distrofina solo se daba el salto de un único exón. El análisis western blot de extractos de proteína de cultivos totales de miotubos obtenidos de pacientes mostró niveles relativamente bajos (menos del 3%) de distrofina. Considerando los
25 altos niveles (70%) observados en el análisis inmunohistoquímico, parece haber una discrepancia. No obstante, esto se puede explicar por el hecho de que en el análisis inmunohistoquímico nos centramos en miotubos positivos para miosina individuales, mientras que las muestras en el análisis de western blot también incluyen un número significativo de células negativas en distrofina. Es más, la muestra de proteínas de control fue derivado de un cultivo que exhibía un grado dos veces más alto de miogenicidad (es decir, aproximadamente el 40% en los cultivos de paciente frente al más del 90% en la muestra de control) y que por consiguiente contenían un número más alto de células productoras de distrofina. Finalmente, la muestra de proteínas de control en el análisis western blot se obtuvo a partir de miotubos expresando distrofina durante todo el periodo de diferenciación (2 semanas), mientras que en los miotubos obtenidos de pacientes la síntesis de distrofina fue solamente inducida en el momento del análisis (como mucho, 4 días). Ya que los miotubos son viables sólo durante varios días después de la transfección, no se pudieron alcanzar periodos de expresión más largos. Se evaluaron proporciones diferentes de los AON específicos de los exones 45 y 51 y los máximos niveles de salto de doble exón fueron obtenidos con una proporción 1:1 (datos no mostrados). Ambos AON fueron aparentemente igualmente eficaces para entrar en el núcleo. Además de saltos de doble exón, también hemos observado saltos de un único exón del exón 44 (paciente DL90.3) y el exón 51 (paciente DL470.2), en particular. Esto sugiere que, probablemente, la estructura secundaria local de pre-ARNm fue más afectada por los AON dirigidos a estos exones, los cuales dejaron los exones 43 y 45 inaccesibles. Para aumentar la probabilidad no sólo de que ambos AON sean absorbidos por el mismo núcleo sino también de que se hibriden con la misma molécula de ARN, diseñamos un AON que consistía en dos AON enlazados por 10 nucleótidos de uracilo. En comparación con la mezcla de los dos AON, el AON de unión U inducía de hecho niveles más altos de salto de multi-exón en los miotubos de control humano y los de un paciente que sufría una delección de los exones 48-50. En cambio, por razones todavía desconocidas fue menos eficaz en inducir el salto de doble exón en los miotubos de un paciente que sufría una delección de los exones 46-50. En los estudios siguientes, evaluamos la influencia de la longitud de la unión U. No observamos diferencias significativas (datos no mostrados). Hay dos explicaciones posibles para el mecanismo de salto de multi-exón. Primero, se puede haber roto el empalme en toda la región tanto de exones como de intrones entre los exones 45 y 51 pueden haber sido empalmadas fuera debido a una alteración total inducida por AON en la estructura secundaria del pre-ARNm. Segundo, el empalme de los exones individuales 45 a 51 puede haber ocurrido antes que el de los exones 44 y 45 (lo cual no es improbable, dado que el intrón 44 tiene 270 kb de largo). En este caso, la maquinaria de empalme consideró los exones 45 a 51 como un exón grande y lo omitió debido a los AON que se hibridaron con los exones 45 y 51. Ésta última explicación sugiere que puede que el salto de multi-exón sea sólo eficaz en aquellas áreas del gen *DMD* en las que los intrones "downstream" se empalman antes que los intrones "upstream". Actualmente estamos verificando esto usando combinaciones diferentes de AON (unión U) en otras regiones del gen. Cuando sólo se tiene en cuenta el salto de un único exón, la terapia de corrección del marco de lectura basada en antisentidos sería teóricamente beneficiosa para más del 75% de todos los pacientes con DMD. El salto de multi-exón extendería significativamente este porcentaje a la mayoría de las mutaciones de *DMD*, excepto a aquellas que afectan los dominios funcionalmente críticos del N-terminal o el dominio C-terminal rico en cisteína o aquellos que implican a la región promotora, el primer exón o translocaciones. No obstante, estas últimas mutaciones se encuentran en menos del 8% de todos los pacientes con DMD registrados en nuestra base de datos (den Dunnen 1996). El salto de multi-exón no sólo aumenta el número de
60
65

pacientes que se beneficiarían de esta estrategia sino que, aún más importante, también disminuye su especificidad de mutación. El salto de multi-exón de los exones 45-51 mostrado en este estudio restauraría el marco para el 14% de todas las deleciones y el 6% de todas las mutaciones pequeñas registradas en la base de datos de mutaciones DMD (den Dunnen 1996). Además, ofrece el potencial terapéutico de generar deleciones dentro del marco de lectura relativamente grandes conocidas por estar asociadas con fenotipos DMB leves (England et al. 1990; Winnard et al. 1993; Mirabella et al. 1998). Su aplicación terapéutica final dependerá en gran medida de su eficacia *in vivo*. Lu et al. (2003) demostraron recientemente el salto del exón 23 inducido por AON en músculo de *mdx* usando el copolímero plurónico F127 como un reactivo de entrega. Se observaron niveles cercanos a la normalidad de una distrofina en casi toda su extensión en muchas miofibras, lo que mejoró la función muscular. Aunque el efecto fue óptimo a las 2-4 semanas, la distrofina era todavía detectable a los 3 meses después de la inyección (Lu et al. 2003). En nuestra experiencia, los efectos *in vivo* e *in vitro* de los AON en células musculares se correlacionan relativamente bien, lo que proporciona una base prometedora para nuestros estudios actuales en el salto de multi-exón en ratones.

[0077] La URL para los datos presentados aquí es como sigue: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/> (para DMD y BMD)

Referencias para el ejemplo 5

[0078]

- Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, Janson A, den Dunnen J, van Ommen G, van Deutekom J (2002) Targeted Exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne Muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 12:S71
- Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Baas F, Van Ommen GJ, et al (2003) Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD Patients. *Hum Mol Genet* 12:907-914
- Bertoni C, Lau C, Rando TA (2003) Restoration of dystrophin expression in *mdx* muscle cells by chimeraplast-mediated exon skipping. *Hum Mol Genet* 12:1087-1099
- Buratti E, Baralle FE, Pagani F (2003) Can a "patch" in a skipped exon make the pre-mRNA splicing machine run better? *Trends Mol Med* 9:229-232
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: Exonic Mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285-298
- Cartegni L, Krainer AR (2003) Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon -specific activators. *Nat Struct Biol* 10:120-125
- Corey DR, Abrams JM (2001) Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biol* 2:reviews1015.1-reviews1015.3
- De Angelis FG, Sthandier O, Berarducci B, Toso S, Galluzzi G, Ricci E, Cossu G, Bozzini I (2002) Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequence against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9456-9461
- den Dunnen J (1996) The Leiden Muscular Dystrophy pages. <http://www.dmd.nl> (accedido 10 de Diciembre, 2003)
- den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, van Paassen HM, van Broeckhoven C, Pearson PL, van Ommen GJ (1989) Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 45:835-847
- Dennis JU, Dean NM, Bennett CF, Griffith JW, Lang CM, Welch DR (1998) Human melanoma metastasis is inhibited following *ex vivo* treatment with an antisense oligonucleotide to protein kinase C- α . *Cancer Lett* 128:65-70
- Di Blasi C, Morandi L, Barresi R, Blasevich F, Cornelio F, Mora M (1996) Dystrophin-associated protein abnormalities in dystrophin-deficient muscle fibers from symptomatic and asymptomatic Duchenne/Becker muscular dystrophy carriers. *Acta Neuropathol (Berl)* 92:369-377
- Dove A (2002) Anti-sense and sensibility. *Nat Biotechnol* 20:121-124
- Dunckley MG, Manoharan M, Villiet P, Eperon IC, Dickson G (1998) Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured *Mdx* muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum Mol Genet* 7:1083-1090
- England SB, Nicholson LV, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Harris JB, Davies KE (1990) Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343:180-182
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP (1990) Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345:315-319
- Friedman KJ, Kole J, Cohn JA, Knowles MR, Silverman LM, Kole R (1999) Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 274:36193-36199
- Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, van Meijjer M, Germeraad WT, Grimbergen J, van Den Doel MA, Vogels R, van Deutekom JCT, Janson AAM, de Bruijn JD, Uytendhaag F, Quax PH, Logtenberg T, Mehtali M, Bout A (2002) Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol* 76:4612-4620
- Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928
- Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, et al (1988) Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from Patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 318:1363-1368
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, et al (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45:498-506

- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53:219-226
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41-54
- 5 Lu QL, Mann CJ, Lou F, Bou-Gharios G, Morris GE, Xue SA, Fletcher S, Partridge TA, Wilton SD (2003) Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 9:1009-1014
- Lu QL, Morris GE, Wilton SD, Ly T, Artem'yeva OV, Strong P, Partridge, TA (2000) Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J Cell Biol* 148:985-996
- 10 Mann CJ, Honeyman K, Cheng AJ, Ly T, Lloyd F, Fletcher S, Morgan JE, Partridge TA, Wilton SD (2001) Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:42-47
- Mann CJ, Honeyman K, McClorey G, Fletcher S, Wilton SD (2002) Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *J Gene Med* 4:644-654
- 15 Mercatante DR, Mohler JL, Kole R (2002) Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and anti neoplastic agents. *J Biol Chem* 277:49374-49382
- Mercatante DR, Sazani P, Kole R (2001) Modification of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy for cancer and other diseases. *Curr. Cancer Drug Targets* 1:211-230
- Mirabella M, Galluzzi G, Manfredi G, Bertini E, Ricci E, DeLeo R, Tonali P, Servidei S (1998) Giant dystrophin deletion associated with congenital cataract and mild muscular dystrophy. *Neurology* 51:592-595
- 20 Murry CE, Kay MA, Bartosek T, Hauschka SD, Schwartz SM (1996) Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J Clin Invest* 98:2209-2217
- Nasevicius A, Ekker SC (2000) Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish. *Nat Genet* 26:216-220
- Roest PA, Roberts RG, van der Tuijn AC, Heikoop JC, van Ommen GJ, den Dunnen JT (1993) Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations. *Neuromuscul Disord* 3:391-394
- 25 Roest PA, van der Tuijn AC, Ginjaar HB, Hoeben RC, Hoger-Vorst FB, Bakker E, den Dunnen JT, van Ommen GJ (1996) Application of in vitro Myo-differentiation of non-muscle cells to enhance gene expression and facilitate analysis of muscle proteins. *Neuromuscul Disord* 6:195-202
- Sherratt TG, Vulliamy T, Dubowitz V, Sewry CA, Strong PN (1993) Exon skipping and translation in Patients with frameshift deletions in the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 53:1007-1015
- 30 Sierakowska H, Sambade MJ, Agrawal S, Kole R (1996) Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12840-12844
- Sironi M, Cagliani R, Pozzoli U, Bardoni A, Comi GP, Giordano R, Bresolin N (2002) The dystrophin gene is alternatively spliced throughout its coding sequence. *FEBS Lett* 517:163-166
- 35 Stevenson JP, Yao KS, Gallagher M, Friedland D, Mitchell EP, Cassella A, Monia B, Kwok TJ, Yu R., Holmlund J, Dorr FA, O'Dwyer PJ (1999) Phase I clinical/pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *J Clin Oncol* 17:2227-2236
- Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M (2001) Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. *Brain Dev* 23:788-790
- 40 Thanh LT, Nguyen Thi M, Hori S, Sewry CA, Dubowitz V, Morris GE (1995) Characterization of genetic deletions in Becker muscular dystrophy using monoclonal antibodies against a deletion-prone region of dystrophin. *Am J Med Genet* 58:177-186
- van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, Ginjaar IB, Baas F, den Dunnen JT, van Ommen GJ (2001) Antisense induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 10:1547-1554
- 45 Wilton SD, Lloyd F, Carville K, Fletcher S, Honeyman K, Agrawal S, Kole R (1999) Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul Disord* 9:330-338
- Winnard AV, Klein CJ, Coovert DD, Prior T, Papp A, Snyder P, Bulman DE, et al (1993) Characterization of translational frame exception Patients in
- 50 Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2:737-744
- Yoshida M, Ozawa E (1990) Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo)* 108:748-752 .

Ejemplo 6

- 55 [0079] Como fármacos de molécula pequeña para la distrofia muscular de Duchenne (DMD), los oligonucleótidos antisentido (AON) han mostrado que restauran el marco de lectura interrumpido de los transcritos de DMD induciendo un salto de exón específico. Esto permite la síntesis de distrofinas tipo DMB, en gran medida funcionales, y la conversión potencial de un fenotipo DMD severo en un DMB más leve. Hasta este momento hemos usado AON de fosforotioato de 2'-O-metilo (2OMePS). Aquí, evaluamos las eficiencias de salto de diferentes análogos de AON que
- 60 contienen morfolino-fosforodiamidato, ácido nucleico bloqueado (LNA) o esqueletos de ácido nucleico peptídico (PNA). A diferencia de los morfolinós y los ANPs, los LNA todavía no han sido probados como moduladores de empalme. En comparación con el más eficaz AON de 2OMePS dirigido al exón 46, el LNA indujo niveles de salto mayores en miotubos de control humano (85% frente al 20%) y una delección del exón 45 en pacientes DMD (98% frente al 75%). Los niveles de salto inducidos por el morfolino fueron sólo del 5-6%, mientras que el PNA parecía ser ineficaz. Análisis comparativos adicionales de LNA y AON de 2OMePS conteniendo hasta tres errores de apareamiento, reveló que los
- 65 LNA, aunque inducen eficiencias de salto mayores, muestran menos especificidad de secuencia. Esta limitación

aumenta el riesgo de efectos adversos en otros lugares del genoma humano. Mientras esperamos mejoras posteriores en oligoquímica, de este modo consideramos actualmente los AON de 2OMePS como los compuestos más favorables para salto del exón DMD escogido como diana.

5 [0080] Se ha informado en diferentes estudios (1) de que los oligonucleótidos antisentido (AON) modulan el empalme de pre-ARNm. Por ejemplo, los AON han restaurado el empalme normal bloqueando sitios de empalme críptico (2,3), alteraron la proporción de empalme alternativo de isoformas malignas a no malignas (4) e indujeron la inclusión de exones para exones mutados, que de otra manera fueron saltados (5). En estos estudios, los tratamientos con AON tenían como objetivo el restablecimiento del ARNm de tipo salvaje. Recientemente, los AON se han usado, como alternativa, para restaurar el marco de lectura interrumpido del ARNm de distrofina en estudios de terapia génica para la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Los pacientes con DMD sufren de degeneración muscular severa debido a mutaciones de interrupción del marco en el gen *DMD* que abortan prematuramente la síntesis de la proteína distrofina (6-9). En cambio, las mutaciones en el gen *DMD* que no afectan al marco de lectura generan distrofinas con delecciones internas pero parcialmente funcionales y resultan en la menos severa distrofia muscular de Becker (DMB) (10,11). La restauración inducida por AON del marco DMD de lectura se basa en inducir el salto de exones específicos. Esto se aplicó satisfactoriamente en células musculares cultivadas de pacientes con distrofia muscular de Duchenne y en el modelo de ratón *mdx* (12-19). Se lograron niveles altos de salto de exón de hasta ~90%, permitiendo la síntesis de niveles significativos de distrofinas tipo DMB en más del 75% de las células tratadas (17). Estas distrofinas se situaron apropiadamente en el sarcolema y restauraron el complejo de glicoproteína distrofina, una fuerte indicación de restauración funcional.

[0081] Los AON usados en este estudio contenían moléculas de ribosa modificada con 2'O-metilo para hacerlos independientes de la RNasa H y un esqueleto de fosforotioato completo (AON de 2OMePSs) (Tabla 6). Aunque los AON de 2OMePSs tienen ventajas tales como resistencia aumentada a la degradación por nucleasa y absorción aumentada en comparación con la de los AON de fosfodiéster, las desventajas son que un esqueleto de fosforotioato es hasta cierto punto citotóxico y puede suscitar una respuesta inmunogénica (20,21).

[0082] Desarrollos recientes en oligoquímica han proporcionado AON con propiedades biofísicas, bioquímicas y biológicas diferentes basadas en varias modificaciones en el azúcar o en el esqueleto de los nucleótidos. Los análogos modificados de AON incluyen morfolino-fosfordiamidatos (morfolinos), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y ácidos péptidonucleicos (PNA) (revisado en 21).

[0083] En los morfolinos el esqueleto de azúcar-fosfato de ADN se sustituye por oligonucleótidos morfolino-fosfordiamidato (tabla 6) (22,23). Los morfolinos son no-tóxicos, resistentes a la nucleasa (23), tienen afinidad aumentada por el ARN y se ha sugerido que afectan a la estructura secundaria del ARN (1,22). Por otro lado, los morfolinos no tienen carga y por lo tanto son difíciles de transfectar. Sin embargo, eficiencias de razonables a buenas han sido obtenidas con la técnica del *scrape loading* o con polietilenimina etoxilada (EPEI) (24,25). Los morfolinos se han usado, entre otras cosas, para estudiar procesos de desarrollo de genes *knockdown* en el pez cebra (26) y para modular el empalme del gen de la β -globina *in vivo* e *in vitro* (25,27). Recientemente, los morfolinos se han aplicado en el modelo de ratón *mdx* para inducir el salto del exón mutado 23 (28). Los morfolinos fueron transfectados en las células en combinación con un oligo sentido (leash) para permitir formación de un lipoplex catiónico. Este tratamiento con morfolino restauró la síntesis de distrofina en células musculares de *mdx* tanto *in vivo* como *in vitro*.

[0084] Los LNA son análogos de ADN que contienen un puente de metileno, el cual conecta el 2'-O de ribosa con el 4'-C (tabla 6). Este puente produce una conformación 3'-endo bloqueada, que reduce la flexibilidad conformacional de la ribosa (1). Los LNA son resistentes a la nucleasa, no tóxicos y tienen la máxima afinidad con el ADN y el ARN complementarios conocida hasta ahora para cualquier análogo de ADN (29,30). Esta alta afinidad ofrece tanto ventajas como inconvenientes: los LNA se hibridarán muy eficazmente con su diana, pero los LNA más largos de 15 pares de bases han mostrado autoestructuración térmicamente estable. Además, en toda su longitud los LNA parecen hibridarse de una manera menos específica de la secuencia que el PNA y AON de 2OMePS (29,31). Los LNA están cargados negativamente y se aplica polímeros de lípidos catiónicos para la entrega en las células. Los LNA han mostrado ser potentes inhibidores de la expresión de un gen relacionado con el cáncer (31), pero no han sido estudiados anteriormente como moduladores de empalme.

[0085] En los PNA el esqueleto de azúcar-fosfato del ADN se sustituye por un esqueleto de poliamida acquiral (Tabla 6) (32). En comparación con el esqueleto de 2OMePS, los PNA tienen una afinidad altamente incrementada por el ADN y el ARN, se ha sugerido que son más específicos de secuencia, resistentes a la proteasa y a la nucleasa y no tóxicos incluso a concentraciones altas (1,33). Un inconveniente de la naturaleza no iónica del PNA es su pobre hidrosolubilidad, que hace complicado transfectar PNA (27,34). Sazani et al. han sorteado recientemente este problema acoplado 4 residuos de lisina al C-término de los PNA (27,35). La naturaleza catiónica de la lisina mejoró altamente la hidrosolubilidad y permitió la entrada en la célula y el núcleo sin reactivo de transfección. Los PNA han sido usados con éxito para modular el empalme de la cadena α y el receptor de interleucina 5 murino *in vitro* y el gen β -globina *in vivo* e *in vitro* (27, 35,36).

[0086] Para futuros estudios clínicos, el análogo preferido de AON induce los niveles más altos de salto de exón a bajos niveles de citotoxicidad. En este estudio hemos comparado la eficacia, eficiencia y aplicabilidad de los análogos de AON

de morfolino, LNA y PNA con los de un AON de 2OMePS descrito previamente (16,37) específico para el exón 46 en DMD en miotubos obtenidos tanto de control como de pacientes.

Resultados

5 Análisis comparativo de los análogos de AON en miotubos humanos de control

[0087] Para determinar la afinidad de enlace de los diferentes análogos de AON (tabla 6) con el pre-ARNm diana, se llevó a cabo un ensayo de cambio de movilidad en geles. AON de ADN, 2OMePS, morfolino, LNA y PNA fueron hibridados con un fragmento de ARN del exón 46 marcado con ³²P (Fig. 13 A). Los AON de ADN, 2OMePS y LNA indujeron un cambio de movilidad claro, indicando que estos análogos son capaces de enlazar con el ARN diana. Ningún cambio de desplazamiento fue detectable para los AON de morfolino y PNA. Esto sugirió una baja afinidad de estos análogos con el ARN diana. No obstante, en experimentos precedentes se observó que algunos AON, aunque no inducían un cambio de movilidad notable, sin embargo sí inducían salto de exón (resultados no publicados). Por esta razón, decidimos incluir todavía los AON de morfolino y PNA en análisis posteriores.

[0088] Las condiciones de transfección para los diferentes análogos de AON, todos ellos portando un grupo de 5'-fluoresceína, fueron optimizados en los miotubos humanos de control (Fig. 13B). Basándose en la presencia de señales fluorescentes nucleares, se determinó que las eficiencias de transfección son típicamente de más del 80% para los AON de 2OMePS, morfolino y LNA. Las eficiencias de transfección del PNA eran generalmente inferiores (~60-70%). Notablemente, a diferencia de los AON de 2OMePS, LNA y PNA, que mostraban la mayor parte de la fluorescencia dentro del núcleo, el morfolino estaba claramente presente también en el citoplasma.

[0089] Experimentos precedentes han revelado que niveles de salto más eficaces, tal y como fueron detectados mediante RT-PCR, fueron obtenidos en una dosis de 500 nM de AON de 2OMePS (17). Aquí mostramos que también los AON de LNA y, notablemente, de morfolino son eficaces para inducir el salto del exón 46 (Fig. 13C). Para los AON de morfolino y LNA, los experimentos de series de concentración indicaron las mayores eficiencias de salto a dosis de 1 µM y 500 nM, respectivamente. Para ambos análogos, concentraciones más altas no resultaron en niveles más altos de salto del exón 46 (datos no mostrados), pero en cambio indujeron serios efectos citotóxicos para el AON de morfolino. Sólo niveles mínimos de citotoxicidad se encontraban presentes en cultivos de miotubos transfectados con 500 nM de LNA seis días post-transfección, mientras que en ese mismo tiempo se observó muerte celular severa para 200 nM de AON de 2OMePS (datos no mostrados). Ya que se aplicaron más unidades de PEI para la transfección de LNA, es improbable que esta diferencia sea debida a la citotoxicidad inducida por la PEI. Hemos observado ocasionalmente el salto los exones tanto 45 como 46 a niveles bajos en respuesta a altas dosis de los AON de 2OMePS y LNA (Fig. 13C). El PNA, de manera persistente, no indujo salto del exón 46, incluso a una dosis de 20 µM (datos no mostrados). Las eficiencias de salto del exón 46 de los diferentes análogos fueron evaluados a través de la cuantificación de los fragmentos RT-PCR (Fig. 13D). En comparación con 2OMePS (20%), AON de LNA fue más eficiente (85%), mientras que los niveles de salto para el morfolino no fueron mayores del 6%.

[0090] Análisis comparativo de los análogos de AON en miotubos obtenidos de paciente. Hemos observado previamente que los AON de 2OMePS inducían niveles más altos de salto de exón en miotubos obtenidos de paciente en comparación con muestras de control (16,17). Este efecto fue aquí confirmado en miotubos obtenidos de un paciente con DMD (DL279.1) afectado por una eliminación del exón 45. Para este paciente, el salto del exón 46 genera transcritos dentro del marco de lectura. Hemos observado un 75% de salto del exón 46 en DL279.1 frente al 20% en los miotubos de control para el AON de 2OMePS (Fig. 13C y 13D). Los AON de LNA y morfolino fueron también capaces de inducir salto de exón (98% y 5%, respectivamente), mientras que el de PNA no (Fig. 13C y 13D). Similarmente al AON de 2OMePS, el de LNA mostraba niveles de salto más altos en DL279.1 en comparación con los de los miotubos de control (98% frente al 85%). Este efecto, no obstante, no era significativo para los AON de morfolino o PNA.

50 Efectos de dosis y especificidad de secuencia del AON de LNA vs. AON de 2OMePS

[0091] Ya que los LNA indujeron niveles de salto más altos, realizamos una serie de concentraciones para determinar la dosis eficaz mínima. Los análisis RT-PCR (Fig. 14A) y cuantitativo (Fig. 14B) mostraron que en los miotubos humanos de control la eficiencia caía marcadamente del 97% al 30% en dosis inferiores a 500 nM y que se podían detectar niveles muy bajos de salto del exón 46 (< 1%) a 100 nM. En miotubos obtenidos de paciente, no obstante, los niveles de salto de exón decrecían más gradualmente a dosis inferiores, con niveles detectables de salto del exón 46 del 86% a una dosis de 300 nM y todavía a un nivel significativo (10%) a 100 nM (Fig. 14AB).

[0092] Después se analizó la especificidad de secuencia de los AON de LNA y 2OMePS en los miotubos de paciente (ya que mostraron niveles de salto más altos que los miotubos de control). Estudiamos cinco LNA diferentes, que contienen uno o dos apareamientos erróneos en las posiciones 5', 3' o central (LNAm1-5, Fig. 15A), y un LNA que fue desplazado en la dirección 3' del exón 46 (LNA9, Fig. 15A). Un ensayo de cambio de movilidad en geles reveló que todos los LNA fueron capaces de enlazarse con el pre-ARNm diana (datos no mostrados). Los LNA fueron luego transfectados en miotubos de paciente a una dosis de 500 nM. El análisis RT-PCR (Fig. 15B) y la cuantificación (Fig. 15C) mostraron que los LNA que contenían 1 o 2 apareamientos erróneos en el extremo 3' (LNAm1 y LNAm4) fueron capaces de inducir el salto del exón 46 a altos niveles, comparables con el 100% original de los LNA

complementarios (71%-94% frente al 100%), sugiriendo que los LNA tienen una especificidad de secuencia reducida. El LNA con un único apareamiento erróneo en el central (LNAmm2) indujo niveles bajos (8%) de salto de exón, mientras que el LNA con dos apareamientos erróneos en el central (LNAmm5) y el LNA con un apareamiento erróneo en 5' (LNAmm3) no inducen salto detectable. El LNA9 no indujo salto del exón 46, incluso aunque es completamente homólogo al exón 46. También evaluamos los efectos de concentraciones inferiores de los LNA con error de apareamiento en 3' y observamos salto de exón a niveles comparativamente inferiores que con LNA8 (datos no mostrados).

[0093] De forma similar hemos probado cinco oligos 2OMePS diferentes conteniendo hasta tres errores de apareamiento en comparación con los oligos 2OMePS originales en miotubos de paciente (2OMePSmm1-5, Fig. 15D). A diferencia de los AON de LNA, los de 2OMePSs que contenían uno o dos errores de apareamiento en el extremo 3' (2OMePSmm1-2) indujeron salto del exón 46 a niveles reducidos en comparación con los oligos originales (7%-17% frente al 48%) (Fig. 15E, F). Los oligos que contienen tres errores de apareamiento en el extremo 3' (2OMePSmm3) o uno en el extremo 5' (2OMePSmm4) indujeron niveles apenas detectables (1%-2%) de salto de exón, mientras que el 2OMePS que contenía tres errores de apareamiento dispersos en todo el oligo (2OMePSmm5) fue incapaz de inducir salto de exón. Experimentos de transfección y análisis RT-PCR del AON de 2OMePS y los LNA con errores de apareamiento fueron repetidos varias veces y mostraron eficiencias reproducibles. Nuestros resultados indican que el AON de 2OMePS tiene una especificidad de secuencia más alta que los LNA.

20 Discusión

[0094] En nuestros estudios precedentes en el salto de exón inducido en antisentido se aplicaron AON de 2OMePS (16,17, 37). En este estudio, análogos adicionales de AON fueron probados para su eficacia, eficiencia y aplicabilidad a la hora de inducir el salto del exón 46 de DMD en los cultivos de miotubos obtenidos de pacientes con DMD y de control. En ensayos clínicos futuros el análogo de AON óptimo debería inducir altos niveles de salto de exón, pero también ser no tóxico, fácil de entregar y, preferiblemente, relativamente poco costoso. De los cuatro análogos alternativos probados aquí, sólo los LNA indujeron niveles más altos de salto de exón en comparación con el AON de 2OMePS. El morfolino fue menos eficaz tanto en miotubos de pacientes como de control, mientras que el PNA fue completamente ineficaz. Para el LNA y AON de 2OMePSs, los niveles de salto de exón fueron más altos en células derivadas de pacientes que en las células de control. Hemos observado previamente este efecto en células de otros pacientes con DMD (17) y hecho la hipótesis de que es debido a la degradación del ARN mediada por sin sentidos (NMD), que se dirigirá selectivamente al producto de salto del marco en los miotubos de control y de este modo influirá negativamente en la cantidad relativa de producto saltado. En células derivadas de pacientes, el ARNm original fuera del marco está sujeto a NMD, mientras que el producto de salto dentro del marco no lo está. Otra explicación puede ser que el salto de exón mediado por AON en realidad se potencia en el paciente debido a la presencia de la delección que ya ha perturbado el empalme local. Los niveles de salto de exón inducido por morfolino fueron comparables en las muestras del paciente y de control (6% vs. 5%).

[0095] El ensayo de movilidad en geles no mostró ningún cambio para los AON de morfolino y PNA, pero a pesar de su aparente baja afinidad por el pre-ARNm diana, el morfolino fue capaz de inducir bajos niveles de salto del exón 46. Esto puede ser explicado por el hecho de que el morfolino se hibridó con a un oligo de ADN sentido (un "*leash*" que permite la transfección acoplada de EPEI), que puede haber interferido con la hibridación apropiada con fragmento de ARNm diana. Después de la transfección en células, el *leash* se despegó del morfolino, que entonces es libre para hibridarse con el ARN diana. Schmajuk et al. encontraron que los morfolinós eran más eficaces restaurando el empalme de tipo salvaje del gen de la β -globina en comparación con el AON de 2OMePS (25). No obstante, ya que hemos observado fluorescencia tanto en el citoplasma como en el núcleo después de las transfecciones de morfolino, los bajos niveles de salto de exón pueden ser el resultado de la pobre absorción nuclear más que de la baja eficiencia del morfolino. La optimización adicional del propio morfolino y el *leash* requerida para la transfección de EPEI puede así aumentar los niveles de salto del exón 46. De hecho, GebSKI et al. han mostrado recientemente que los niveles de salto del exón 23 en el ratón *mdx* variaban cuando se usaban *leash* diferentes (28).

[0096] Incluso aunque las secuencias de los análogos de PNA y LNA son completamente idénticas, el LNA induce altos niveles de salto del exón 46 mientras que el PNA no induce ningún salto detectable. Se ha informado de que oligos de PNA inducen niveles más altos de ARNm de β -globina correctamente empalmado que los análogos de morfolino y 2OMePS (27,35). Esto indica que el PNA es, de hecho, capaz de modular el empalme y sugiere que la falta de salto del exón 46 en nuestros experimentos puede venir de la incapacidad de nuestro PNA para enlazarse a la secuencia específica de ARN diana, o a una pobre estabilidad del complejo ARN-PNA. Experimentos adicionales pueden identificar PNA con afinidades de enlace más altas por secuencias diana del exón 46.

[0097] Los LNA son análogos de AON relativamente nuevos que hasta ahora sólo han sido aplicados para inhibir la expresión de genes diana (29,31). Mostramos aquí que los LNA son también moduladores muy potentes de empalme de pre-ARNm. En una serie de experimentos el LNA indujo salto del exón 46 en el 85% de los transcritos de control y en el 98% de los transcritos de un paciente con DMD que sufre una delección del exón 45. En la comparación, los AON de 2OMePS previamente usados indujeron un 20% de salto del exón 46 en las células de control y un 75% de salto en los transcritos con delección del exón 45. Notablemente, el LNA también pareció ser menos tóxico que los AON de 2OMePS.

[0098] Basándose en estos resultados, el LNA, en principio, puede ser una alternativa prometedora para los estudios de salto de exón inducido por antisentidos. Desafortunadamente, no obstante, debido a que tiene una secuencia más corta (14-mer), muestra homología completa con otras secuencias en el genoma humano. La mayor parte de éstas fueron localizadas dentro de regiones no codificadoras, tanto dentro como cerca de los genes. Aumentar la longitud del LNA potencia la especificidad (29). Nuestros resultados con LNA que contenían errores de apareamiento muestran que los LNA con uno o dos errores de apareamiento en la parte 3' del AON fueron casi tan potentes como el LNA específico. Esto sugiere que la unión de sólo 12 pares de bases es suficiente para inducir el salto del exón 46, lo cual no es sorprendente, dadas las temperaturas de fusión extremadamente altas del LNA (se ha predicho que es 131 °C para nuestro LNA de 14 mer; Tabla 6). Esto, no obstante, implica que nuestro LNA específico de exón 46 puede también enlazarse perjudicialmente con otras secuencias en el genoma humano que contienen estos 12 pares de bases. El LNA puede enlazar con secuencias aún más cortas, ya que, por ejemplo, un 7-mer todavía tiene una temperatura de fusión predicha de más de 60 °C. Hemos inyectado recientemente LNA humano en músculo de ratón. Con un error de apareamiento en comparación con la secuencia de ratón, el LNA humano fue capaz de inducir salto del exón murino 46, incluso a concentraciones bajas. Para reducir la afinidad por el ARN, se han generado oligos de LNA quimérico/ ARN 2'-O-metilo (38). Estas quimeras tienen temperaturas de fusión inferiores a las del LNA completo pero todavía tienen afinidades más altas por el ARN que los AON de 2OMePS. De hecho, se ha mostrado que los LNA quiméricos bloquean la transcripción del elemento responsivo transactivador del VIH-1 *in vitro* (38).

[0099] Nuestros resultados con AON de 2OMePS que contienen errores de apareamiento muestran que estos análogos son más específicos de secuencia que los LNA. La presencia de un error de apareamiento en el extremo 3' final produce una reducción de casi el triple en los niveles de salto del exón 46, mientras que no hubo ningún salto de exón con los AON de 2OMePS que contenían tres 3' errores de apareamiento. Se podría haber anticipado un efecto mayor en un único error de apareamiento en el LNA de 14 mer, más corto, que en el AON de 2OMePS de 20 mer, más largo. No obstante, se encontró que lo opuesto era cierto para el extremo 3'. Es más, tanto para el LNA como para los análogos de 2OMePS, los errores de apareamiento en el extremo 3' inducían niveles más altos de salto del exón 46 que los del extremo 5' o los del centro de los AON. Esto sugiere que, tanto si es debido a la presencia del marcador fluorescente como si no, los errores de apareamiento en el extremo 5' final redujeron la afinidad por el ARN diana en una mayor medida.

30 Materiales y métodos

AON y cebadores

[0100] Las características de los análogos de AON en este estudio son revisadas en la tabla 6. Los AON de 2OMePS (secuencias mostradas en la Fig. 15D; Eurogentec, Bélgica) tienen un esqueleto completo de fosforotioato y moléculas de ribosa modificadas de 2'-O-metilo, tal y como se ha descrito anteriormente (16,37). El morfolino (Gene-Tools; US) tiene un esqueleto de morfolino fosforoamidato y está unido a un oligo de ADN sentido para la transfección de EPEI. Los LNA (secuencias mostradas en la Fig. 15A; Proligo, Francia) tienen esqueletos completos de ácidos nucleicos bloqueados. El PNA (Eurogentec; Bélgica) tiene un esqueleto de ácido nucleico peptídico y 4 residuos de lisina en el extremo C-terminal para mejorar la hidrosolubilidad y facilitar la transfección en las células. Todos los AON contienen un grupo 5'-fluoresceína (6-FAM).

Ensayo de cambio de movilidad en gel

[0101] El ARN del exón 46 de distrofina en humanos fue transcrito *in vitro* como se ha descrito previamente (16). La afinidad de enlace de los AON individuales (en una dosis de 0,5 pmol) fue determinada mediante incubación durante la noche en un tampón de hibridación (1 mM Tris- HC pH 7.4, 50 nM NaCl, 5 mM MgCl₂) a 37°C, seguido por PAGE 8% y análisis PhosphorImager (Molecular Dynamics).

50 Cultivos de células miogénicas y transfección

[0102] Mioblastos primarios de humano de un control no afectado y de un paciente con DMD (DL279.1; que sufre una delección del exón 45) fueron aislados a partir de biopsias musculares y cultivados como se ha descrito anteriormente (37). Los miotubos fueron obtenidos de cultivos de mioblasto confluyente, después de 7 a 14 días de privación de suero. Con los AON de 2OMePS y LNA, se usó PEI para la transfección, según las instrucciones del fabricante (ExGen500; MBI Fermentas), con 3.5 µl de PEI por µg de AON transfectado (es decir, 12.9 µl (70 µM) para el 2OMePS y 9.2 µl (50 µM) para el oligo LNA). Se usó EPEI para transfectar el AON de morfolino según las instrucciones del fabricante, con 1 µl de EPEI de 200 µM (Gene-Tools; USA) por cada 200 nmol de morfolino. Los PNA fueron aplicados al medio de cultivo de 1ml, sin ningún reactivo de transfección. Tres horas post-transfección se añadió medio de cultivo de 2ml.

60 Aislamiento de ARN, RT-PCR y análisis de secuencias

[0103] El aislamiento del ARNm, el análisis RT-PCR y la secuenciación directa fueron realizados como se describe (17). Las PCR primarias incluyeron cebadores en los exones 43 (CCTGTGGAAGGGTGAAGC) y 48 (CTGAACGTCAAATGGTCCTTC); PCR anidadas incluyeron cebadores en los exones 44 (CGATTTGACAGATCTGTTGAG) y 47 (GAGCACTTACAAGCACGGG). Todos los cebadores fueron sintetizados por

Eurogentec (Bélgica). Para cuantificación, los productos de salto fueron analizados utilizando el DNA 1000 LabChip® Kit en el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA).

Referencias para el ejemplo 6

- 5 [0104]
- 1 Braasch DA, Corey DR. Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 2002; 41: 4503-4510 .
 - 2 Suwanmanee T et al. Repair of a Splicing Defect in Erythroid Cells from Patients with beta-Thalassemia/HbE Disorder. *Mol Ther* 2002; 6: 718-726 .
 - 10 3 Friedman KJ et al. Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 1999; 274: 36193-36199 .
 - 4 Mercatante DR, Sazami P, Kole R. Modification of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy for cancer and other diseases. *Curr Cancer Drug Targets* 2001; 1: 211-230 .
 - 15 5 Cartegni L, Krainer AR. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 120-125 .
 - 6 Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928 .
 - 7 Hoffman EP et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1988; 318: 1363-1368 .
 - 20 8 Koenig M et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 498-506 .
 - 9 Ervasti JM et al. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990; 345: 315-319 .
 - 25 10 Di Blasi C et al. Dystrophin-associated protein abnormalities in dystrophin-deficient muscle fibers from symptomatic and asymptomatic Duchenne/Becker muscular dystrophy carriers. *Acta Neuropathol (Berl)* 1996; 92: 369-377 .
 - 11 Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53: 219-226 .
 - 30 12 Dunckley MG et al. Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1083-1090 .
 - 13 Wilton SD et al. Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul Disord* 1999; 9: 330-338 .
 - 35 14 De Angelis FG et al. Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9456-9461 .
 - 15 Takeshima Y et al. Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. *Brain Dev* 2001; 23: 788-790 .
 - 40 16 van Deutekom JC et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1547-1554 .
 - 17 Aartsma-Rus A et al. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 907- 914 .
 - 18 Aartsma-Rus A et al. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am. J Hum Genet* 2004; 74: 83-92. Epub 2003 Dec 2016 .
 - 45 19 Lu QL et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 2003; 6: 6 .
 - 20 Agrawal S. Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 53-68 .
 - 50 21 Manoharan M. Oligonucleotide conjugates as potential antisense drugs with improved uptake, biodistribution, targeted delivery, and mechanism of action. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12: 103-128 .
 - 22 Ekker SC, Larson JD. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* 2001; 30: 89-93 .
 - 23 Summerton J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 141-158 .
 - 24 Morcos PA. Achieving efficient delivery of morpholino oligos in cultured cells. *Genesis* 2001; 30: 94-102 .
 - 55 25 Schmajuk G, Sierakowska H, Kole R. Antisense oligonucleotides with different backbones. Modification of splicing pathways and efficacy of uptake. *J Biol Chem* 1999; 274: 21783-21789 .
 - 26 Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 2000; 26: 216-220 .
 - 27 Sazani P et al. Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 1228-1233 .
 - 60 28 GebSKI BL et al. Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1801-1811 .
 - 29 Braasch DA, Liu Y, Corey DR. Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 5160-5167 .
 - 30 Leumann CJ. DNA analogues: from supramolecular principles to biological properties. *Bioorg Med Chem* 2002; 10: 841-854 .
 - 65 31 Fluiter K et al. In vivo tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense

oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 953-962 .

32 Larsen HJ, Bentin T, Nielsen PE. Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 159-166 .

33 Mologni L et al. Additive antisense effects of different PNAs on the in vitro translation of the PML/RARalpha gene. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1934-1938 .

34 Ray A, Norden B. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *Faseb J* 2000; 14: 1041-1060 .

35 Sazani P et al. Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 3965-3974 .

36 Karras JG et al. Deletion of individual exons and induction of soluble murine interleukin-5 receptor-alpha chain expression through antisense oligonucleotide-mediated redirection of pre-mRNA splicing. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 380-387 .

37 Aartsma-Rus A et al. Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2002; 12: S71 .

38 Arzumanov A et al. Inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans activation by steric block chimeric 2'-O-methyl/LNA oligoribonucleotides. *Biochemistry* 2001; 40: 14645-14654

Ejemplo 7

Salto de multi-exón

[0105] Otros ejemplos de salto de multi-exón que restauran el marco pueden incluir los tramos entre los exones 17 y 48 (una delección de los exones 17-48 es una mutación muy grande conocida por estar asociada con un fenotipo tipo DMB leve) que serían terapéuticas para el ~20% de las mutaciones de DMD, los exones 19 a 51 (35% de aplicabilidad), 48 a 59 (18% de aplicabilidad), o 42 a 55 (65% de aplicabilidad). Especialmente ésta última combinación, incluida aquí como otro ejemplo (Figura 8), se aplicaría así a un grupo grande de pacientes. Hemos demostrado la viabilidad del salto de multi-exón 42-55 en miotubos humanos de control que se trataron, o bien con una mezcla de h42AON1 y h55AON1 (ver Tabla 2), o con un AON combinado que contiene estos dos AON unidos por 10 nucleótidos de uracilo. Después de la transfección de estos AON, mezclados o "unidos en U", en los miotubos, el análisis RT-PCR demostró eficiencias similares a la hora de inducir el anticipado transcrito dentro del marco con el exón 42 empalmado al exón 55 (Fig.16). El análisis de secuencias confirmó que este salto multi-exón en particular ocurría específicamente y exactamente en los bordes del exón (datos no mostrados).

[0106] Estos experimentos fueron realizados como se describe para el salto de multi-exón 45-51 (ver MATERIAL Y MÉTODOS para el ejemplo 5)

Breve descripción de los dibujos

[0107]

Figura 1. Análisis de secuencias y RT-PCR de fragmentos de ARNm de distrofina de los cultivos de miotubos del paciente con DMD tratado con AON, concentrado en las regiones que abarcan los exones escogidos para ser saltados. Transcritos nuevos más cortos se observaron en comparación con los cultivos de miotubos no transfectados (NT). El análisis de secuencias confirmó el salto preciso de los exones escogidos. Un producto empalmado de manera alternativa, detectado para el paciente 50685.1 (C), fue secuenciado y se encontró que se derivaba de la activación de un sitio de empalme críptico en el exón 51. Fragmentos más cortos, detectados en los cultivos de miotubos no transfectados de DL 363.2 (B), DL 589.2 (D) y 53914.1 (E), fueron secuenciados y se encontró que eran el resultado del salto espontáneo de los exones 44, 50 y 53, respectivamente. Nótese que en algunos análisis, fragmentos adicionales, ligeramente más cortos que los productos de tipo salvaje, estaban presentes. Esto fue debido a la formación de heterodúplex. 100 pb: tamaño de marcador, -RT-PCR: control negativo.

Figura 2. Análisis inmunohistoquímico de los cultivos de miotubos tratados con AON de 6 pacientes con DMD diferentes. Las células fueron teñidas para miosina para identificar miotubos completamente diferenciados (no mostrado). Los anticuerpos monoclonales MANDYS1 (viñeta central) y Dys2 (viñeta derecha) fueron usados para detectar distrofina de 1 a 4 días post-transfección. Ninguna señal de distrofina pudo ser detectada en células no tratadas teñidas con MANDYS1 (viñeta izquierda) ni con Dys2 (no mostrado), mientras que señales de distrofina claras, principalmente citoplasmáticas, pudieron ser detectadas para cada paciente a continuación del salto de exón inducido. En los pacientes DL 363.2 (B), DL 589.2 (D) y 53914.1 (E) se pudieron observar señales de membrana de distrofina. Notamos que las señales de membrana eran encontradas más frecuentemente para Dys2, que reconoce la distrofina completa. MANDYS1 reconoce una parte interna de la distrofina y es más propensa a generar señales citoplasmáticas, ya que ésta también detecta distrofina en las primeras etapas de la síntesis. Magnificación 63x.

Figura 3. Análisis de western blot de los cultivos de miotubos tratados con AON. El anticuerpo monoclonal DY4 fue usado para detectar distrofina. Extractos de proteína aislados de cultivos de miotubos de control humano (HC) fueron usados como control positivo (C y F). Para evitar sobreexposición, esta muestra fue diluida en una proporción de 1 a 10. Para demostrar igual carga de muestras de proteína, se tiñeron adicionalmente manchas con un anticuerpo contra la

miosina. No se detectaron, o, como resultado del salto de exón espontáneo, se detectaron muy bajos (B y C) niveles de distrofina en los cultivos de miotubos no transfectados (NT). Se observaron señales claras de distrofina en cultivos de miotubos tratados con AON para cada uno de los pacientes. Para 50685.1 y DL 363.2, se realizó un experimento de curso temporal. La distrofina pudo ser detectada 16 horas post-transfección y se encontró a niveles crecientes a las 24 horas y 48 horas post-transfección para 50685.1 (D). Para DL 363.2 se pudo detectar distrofina a niveles crecientes hasta 7 días post-transfección (B). Para los pacientes DL 515.2 (A), DL 363.2 (B) y DL 589.2 (E) la distrofina detectada era significativamente más corta que la distrofina de control. Esto se debe al tamaño de las delecciones en estos pacientes.

Figura 4. El análisis inmunohistoquímico de 4 proteínas DGC de cultivos de miotubos tratados del paciente DL 363.2. Las células fueron teñidas para miosina para identificar miotubos suficientemente diferenciados (no mostrado). Los anticuerpos monoclonales NCL-a-SARC, NCL-b-SARC, NCL-g-SARC y NCL-b-DG fueron usados para detectar α -sarcoglicano, β -sarcoglicano, γ -sarcoglicano y β -distroglicano, respectivamente. Estas proteínas se detectaron en porcentajes reducidos (~40%) en miotubos no tratados, y estaban principalmente localizadas en el citoplasma (A). Después del tratamiento con AON, no obstante, se detectó α -sarcoglicano en el 70%, β -sarcoglicano en el 90%, γ -sarcoglicano en el 90% y β -distroglicano en el 80% de los miotubos, y las proteínas estaban principalmente ligadas a la membrana (B). Magnificación 63x.

Fig. 5. Análisis RT-PCR de ARNm de distrofina humano en las regiones que abarcan los exones escogidos para ser saltados. Fragmentos de transcritos nuevos más cortos se observaron después de la transfección con los diferentes AON en comparación con los cultivos de miotubos no transfectados (NT). El análisis de secuencias (no mostrado) confirmó el salto de los exones escogidos, como se indica en las etiquetas junto a las imágenes. Productos empalmados de manera alternativa se detectados en las regiones alrededor del exón 2 (b), exón 29 (c) y exón 51 (h), fueron secuenciados y se encontró que se derivaban tanto del salto de exones adyacentes como del uso de sitios de empalme críptico. No se obtuvieron productos específicos de (RT-) PCR. En algunos análisis, fragmentos adicionales, ligeramente más cortos que los productos de tipo salvaje, estaban presentes. Esto fue debido a la formación de heterodúplex.

Figura 6. Salto de doble exón en el paciente DL90.3 con DMD que sufre una mutación sin sentido en el exón 43 fuera del marco. El análisis RT-PCR de fragmentos de ARNm de distrofina de miotubos tratados con AON de este paciente mostró un transcrito nuevo, más corto, que no estaba presente en los miotubos no transfectados (NT). El análisis de secuencias confirmó el salto preciso de los exones escogidos 43 y 44. Además de este doble salto, también detectamos un salto único del exón 44. Nótese que el fragmento adicional, ligeramente más corto que el producto de tipo salvaje, se debe a la formación de heterodúplex. 100 pb: marcador de tamaño, -RT-PCR: control negativo.

Figura 7. Salto de doble y de multi-exón en miotubos de control humano (KM 109), Paciente DL 470.2 con DMD, que sufre una delección de los exones 46 a 50, y Paciente 50685.1 con DMD, que sufre de una delección de los exones 48 a 50. (A) Análisis RT-PCR de fragmentos de ARNm de distrofina en los cultivos de miotubos tratados, o bien con una mezcla de h45AON5 y h51AON2 (mezcla) o con una combinación enlazada U de AON (U: h45AON5 enlazado a h51AON2 por 10 nucleótidos de uracilo). En todas las muestras tratadas tanto con la mezcla de AON como con el AON enlazador a U, se detectó un fragmento más corto de transcrito que contenía el exón 44 empalmado al exón 52 y que no estaba presente en los miotubos no tratados (NT). Este nuevo transcrito dentro del marco surgió de salto de doble exón en el paciente DL 470.2 (los exones escogidos 45 y 51 están directamente flanqueando la delección), pero de salto de multi-exón tanto en el control humano como en el paciente 50685.1. En los cultivos de miotubos de pacientes tratados, se observaron fragmentos adicionales más cortos debido a saltos de exón único 45 y de exón único 51. Nótese que en algunas líneas, otros fragmentos, ligeramente más cortos que los productos tipo salvaje, estaban presentes. Esto se debió a la formación de heterodúplex. 100 pb: marcador de tamaño, -RT-PCR: control negativo. (B) Todos los fragmentos fueron cuantificados usando el DNA 7500 labchip® y el Bioanalyzer (Agilent). El porcentaje de saltos de doble o multi-exón de los exones 45 a 51 fue determinado por la proporción de este fragmento respecto al total de fragmentos de transcrito. El AON combinado con U parece menos eficaz en DL 470.2, pero más eficaz en KM 109 y 50685.1, cuando se compara con la mezcla de AON.

Figura 8

Visión esquemática de conjunto del salto de doble y multi-exón y en tres pacientes con DMD y un control humano. Los AON se indican con líneas azules. Los cebadores para análisis RT-PCR se indican mediante flechas. A, el paciente DL90.3 tiene una mutación sin sentido en el exón 43 (indicada por un asterisco). El transcrito fuera del marco resultante se indica en rojo. En contraste con el salto de exón único de los exones 43 o 44, salto de doble exón de ambos exones restaura el marco de lectura (transcrito dentro del marco de lectura indicado en verde). Cuando los miotubos derivados de este paciente son escogidos por AON específicos para los exones 43 e 44, además del salto de doble exón anticipado, se puede esperar también el salto de exón único del exón 43 y el exón 44 (indicado por las líneas rojas discontinuas). El paciente DL470.2 sufre una delección de los exones 46-50, que produce un desplazamiento del marco de lectura y un codón de terminación en el exón 51. El salto de exón único de los exones 45 y 51 no es restaurador del marco, mientras que salto de doble exón de ambos exones 45 y 51 sí lo es. B, salto de multi-exón de los exones 45-51 preserva el marco de lectura en un transcrito de control (individuo KM109). El paciente 50685.1 sufre una delección de los exones 48-50, dando como resultado un codón de terminación en el exón 51. El salto de multi-exón de los exones

45, 46, 47, y 51 restaura el marco de lectura para este paciente. Además del salto de exones 45-51, el salto de exón único del exón 45 y exón 51 puede también ser esperado.

Figura 9

5 Salto de doble exón en el paciente DL90.3, que sufre una mutación sin sentido en el exón fuera del marco 43. A, análisis RT-PCR de fragmentos de ARNm de distrofina en cultivos de miotubos tratados con AON mostró un nuevo transcrito, más corto, que no está presente en los cultivos de miotubos no transfectados (NT). El análisis de secuencias confirmó el salto preciso tanto del exón 43 como del exón 44. Junto con el salto doble, también detectamos un único salto del exón 44 pero no un salto de exón único del exón 43. Nótese que fragmentos adicionales débiles, ligeramente más cortos que los productos de tipo salvaje, estaban presentes. Estos se derivaron de la formación de heterodúplex. 10 100 pb: tamaño de marcador, -RT-PCR: control negativo. B, análisis inmunohistoquímico de los cultivos de miotubos tratados con AON. Las células fueron teñidas para miosina para identificar miotubos completamente diferenciados (viñeta inferior). Los anticuerpos monoclonales MANDYS1 y Dys2 fueron usados para detectar distrofina 2 días después de la transfección. No se pudieron detectar señales de distrofina en células no tratadas teñidas con MANDYS1 (viñeta izquierda) o Dys2 (no mostrado), mientras que señales claras de distrofina pudieron ser detectadas en células tratadas, para ambos anticuerpos de distrofina. Magnificación 63x. C, análisis de western blot de los cultivos de miotubos tratados con AON. El anticuerpo monoclonal Dys1 fue usado para detectar distrofina. Extractos de proteína aislados a partir de fibroblastos de control humano (HC) transducidos por MyoD fueron usados como control positivo. Para evitar sobreexposición, esta muestra fue diluida en una proporción 1:5. Para confirmar igual carga de muestras de proteína, se 20 tiñeron adicionalmente manchas con un anticuerpo contra la miosina. No se detectó distrofina en cultivos de miotubos NT. Se observaron señales claras de distrofina en cultivos de miotubos tratados con AON después de 2 días, que se incrementaron a los 4 días.

Figura 10

25 Salto de doble exón en el paciente DL470.2, que sufre una deleción de los exones 46-50. A, el análisis RT-PCR de fragmentos de ARNm de distrofina de cultivos de miotubos tratados con AON mostraron un nuevo transcrito, más corto, no presente en cultivos de miotubos NT. El análisis de secuencias confirmó el salto preciso tanto del exón 45 como del exón 51. Junto con el doble salto, también detectamos un salto de exón único del exón 51 pero ningún salto de exón único del exón 45. Debido a la formación heterodúplex, observamos fragmentos adicionales débiles, ligeramente más cortos que los productos de tipo salvaje. 100 pb = marcador de tamaño; RT-PCR = control negativo. B, análisis 30 inmunohistoquímico de cultivos de miotubos tratados con AON. Las células fueron teñidas para miosina para identificar miotubos completamente diferenciados (viñeta inferior). Los anticuerpos monoclonales MANDYS1 y Dys2 fueron usados para detectar distrofina 2 días después de la transfección. En las células tratadas, señales claras de distrofina pudieron ser detectadas para ambos anticuerpos, en contraste con las células no tratadas teñidas con MANDYS1 (viñeta izquierda) o Dys2 (no mostrado). Magnificación 63x. C, el análisis western blot de cultivos de miotubos tratados con AON. El anticuerpo monoclonal Dys1 fue usado para detectar distrofina. Extractos de proteínas aislados a partir de miotubos de control humano fueron usados como control positivo, que fue diluido 1: 10 para evitar sobreexposición. Para confirmar igual carga de muestras de proteína, se tiñeron adicionalmente manchas con un anticuerpo contra la miosina. No se detectó distrofina en los cultivos de miotubos NT, mientras que señales claras de distrofina fueron 40 observadas en cultivos de miotubos tratados con AON después de 1 día, que se incrementaron después de 2 días. Nótese que la distrofina del paciente DL470.2 es más corta que la distrofina de control. Esto está correlacionado con el tamaño de la deleción.

Figura 11

45 Análisis RT-PCR del transcrito DMD completo de ARN, aislado a partir de miotubos no tratados (-) y tratados (+) de ambos pacientes. Los patrones de salto de exón específicos esperados están presentes en los fragmentos que contienen los exones 34-45 (paciente DL90.3) y 42-53 (pacientes DL90.3 y DL470.2). Nótese que debido a la deleción de los exones 46-50, el fragmento de tipo salvaje para este paciente es más corto que el del paciente DL90.3. No se detectó ninguna anomalía de empalme inesperada en otras partes del gen DMD, confirmando la especificidad de secuencia de los AON. "M" es el marcador de tamaño de 100 pb. 50

Figura 12

Salto de doble y multi-exón en miotubos del control humano (individuo KM109) y de los pacientes DL470.2 (deleción de los exones 46-50) y 50685.1 (deleción de los exones 48-50). A, análisis RT-PCR de fragmentos de ARNm de distrofina 55 en los cultivos de miotubos tratados con, bien una mezcla de h45AON5 y h51AON2 (mezcla) o una combinación enlazada por U de estos AON (U). En todas las muestras tratadas tanto con la mezcla de AON como con el AON enlazado por U, se detectó un fragmento más corto de transcrito que contenía el exón 44 empalmado precisamente al exón 52 (confirmado por análisis de secuencias; datos no mostrados). Éste no estaba presente en los miotubos NT. El nuevo transcrito dentro del marco surgió del salto de doble exón en el paciente DL470.2 (los exones escogidos 45 y 51 están flanqueando la deleción), pero tanto en el control como en el paciente 50685.1 el transcrito fue un resultado de salto de multi-exón. También se observaron fragmentos adicionales más cortos, que fueron producidos por salto de exón único (exones 45 o 51) o salto multi-exón parcial (exones 46-51). Nótese que en algunas líneas, otros fragmentos, ligeramente más cortos que los productos de tipo salvaje, estaban presentes. Este fue un resultado de la formación de heterodúplex. 100 pb = marcador de tamaño; RT-PCR = control negativo. B, dibujo esquemático del AON enlazado por U. El AON específico para el exón 51 (h51AON2) se enlaza al AON específico para el exón 45 (h45AON5) mediante 10 nucleótidos de uracilo. C, todos los fragmentos fueron cuantificados utilizando el DNA 1000 LabChip y el Bioanalyzer

(Agilent). El porcentaje de saltos de doble o multi-exón de los exones 45-51 fue determinado por la proporción de este fragmento con respecto al total de fragmentos de transcrito. En contraste con el paciente DL470.2, el AON enlazado por U fue más eficaz para los pacientes KM109 y 50685.1, comparado con la mezcla de AON individuales.

5 Figura 13

Análisis comparativo de los AON de ADN, 2OMePS, morfolino, LNA y PNA dirigidos hacia el exón 46.

10 A) Ensayo de cambio de movilidad en gel con fragmento de ARN de un exón 46 radiomarcado, hibridado con los diferentes análogos. Un cambio claro de movilidad fue observado para los AON con el esqueleto de ADN y LNA, el cual es menos prominente para el AON de 2OMePS. Ningún cambio fue observado para el morfolino, el PNA o un AON aleatorio.

15 B) Transfección de los diferentes análogos de AON en miotubos de control. Se obtuvieron eficiencias de más del 80% para el 2OMePS, el morfolino y los AON de LNA, mientras que para los PNA las eficiencias fueron del 60% al 70%. En contraste con los otros análogos de AON, el morfolino era también abundante en el citoplasma.

20 C) Análisis RT-PCR de fragmentos de ARNm de distrofina tanto de miotubos de control no afectados como derivados de pacientes con DMD (DL279.1) después de la transfección de los diferentes análogos de AON. Con la excepción del PNA, se detectó salto del exón 46 para cada análogo, tanto en los miotubos de paciente como de control. El salto preciso del exón 46 fue confirmado por análisis de secuencias (datos no mostrados). 100 pb es el marcador de tamaño de ADN.

25 D) Cuantificación de productos RT-PCR. El porcentaje de salto del exón 46 fue determinado por la proporción del fragmento más corto con respecto al total de fragmentos de transcrito y muestra arriba en cada columna. El LNA indujo niveles máximos inducido de salto de exón tanto en los miotubos de control no afectado (85%) como en los derivados de paciente (98%). El AON de 2OMePS fue notablemente más eficaz en los miotubos obtenidos de paciente en comparación con los de control (75% frente al 20%, respectivamente). El morfolino fue sólo moderadamente eficaz (5-6%) tanto en los miotubos de control como en los derivados de paciente.

30 Figura 14.

Serie de concentraciones de LNA8 en cultivos de miotubos de control y derivados de paciente (DL279.1).

35 A) Análisis RT-PCR de fragmentos de ARNm de distrofina. Niveles significativos de salto del exón 46 fueron observados en cada dosis probada para el paciente (DL279.1), mientras que sólo niveles bajos fueron detectados para una dosis de 200 nM y 100 nM en el control humano. En los miotubos de control, el salto tanto del exón 45 como del 46 se observó a veces para las dosis más altas (400 y 500 nM). Para algunos fragmentos de DL279.1, pudieron ser observados productos ligeramente más grandes que los fragmentos de tipo salvaje. Este se debe a la formación de heterodúplex de primeros y segundos productos PCR. 100 pb es el marcador de tamaño de ADN.

40 B) La cuantificación de los fragmentos RT-PCR ha mostrado que los niveles de salto de exón decrecen considerablemente a dosis por debajo de 500 nM para el control humano (de 97% a 500 nM hasta 30% a 400 nM y por debajo de 1% a 100 nM), pero siguen siendo altos (86%) a una dosis de 300 nM para el paciente y son todavía significativos (10%) con una concentración de 100 nM.

45 Figura 15.

Análisis de los AON de LNA y de 2OMePSs que contienen errores de apareamiento en miotubos derivados de pacientes.

50 A) Secuencias de los diferentes LNA alineadas con su secuencia diana en el exón 46 (representadas en la parte superior de 3' a 5'). Los errores de apareamiento en la secuencia diana están subrayados. El LNA9 se desplaza hacia el extremo 3' de la secuencia diana en comparación con el LNA original (LNA8) y es completamente homólogo a la secuencia diana.

55 B) Análisis RT-PCR y C) cuantificación de fragmentos de ARNm de distrofina de miotubos de paciente (DL279.1) tratado con LNA. Los LNA que contienen errores de apareamiento en el extremo 3' (LNAm1 y 4) indujeron salto del exón 46 hasta niveles que son comparables a los inducidos por el LNA original (71%-94% frente al 100%). Los errores de apareamiento en el 5' o en la parte central (LNAm2 y 5) redujeron seriamente la capacidad de salto (<8%). Fragmentos ligeramente más grandes que los de la banda de tipo salvaje fueron observados. Esto se debe a la formación de heterodúplex entre primeros y segundos productos de PCR. 100 pb es el marcador de tamaño de ADN.

60 D) Secuencias de los diferentes AON de 2OMePSs alineadas con la secuencia diana en el exón 46 (representadas en la parte superior de 3' a 5'). Los errores de apareamiento en la secuencia diana están subrayados.

65 E) Análisis RT-PCR y F) cuantificación de fragmentos de ARNm de distrofina de miotubos de paciente (DL279.1) tratado con 2OMePS. La presencia de 1 error de apareamiento en el extremo 3' (2OMePSm1) produce ya una reducción de

más de 2.5 veces en los niveles de salto de exón, mientras que se encuentran niveles aún más reducidos para los AON que contienen 2 y 3 errores de apareamiento (2OMePSmm2 y 3). Prácticamente ningún salto fue inducido por los AON que contienen un único error de apareamiento en el extremo 5' (2OMePSmm4) o un único error de apareamiento en el extremo 3' y la parte central así como en el extremo 5' (2OMePSmm5) de los oligos. 100 pb es el marcador de tamaño de ADN.

Figura 16

Salto de multi-exón 42 a 55 en miotubos de control humano (KM 109). Análisis RT-PCR de fragmentos de ARNm de distrofina en los cultivos de miotubos tratados, o bien con una mezcla de h42AON1 y h55AON1 (mezcla) o con una combinación enlazada por U de AON (U: h42AON1 enlazado a h55AON1 por 10 nucleótidos de uracilo). En todas las muestras tratadas tanto con la mezcla de AON como con el AON enlazador por U, se detectó un fragmento más corto de transcrito que contenía el exón 42 empalmado al exón 55 y que no estaba presente en los miotubos no tratados (vía 2 "NT"). Este nuevo transcrito dentro del marco del salto de multi-exón de un tramo de exones entre el 42 y el 55. Fragmentos adicionales más cortos fueron observados debido a patrones de empalme alternativos. Además, nótese que en algunas líneas otros fragmentos, ligeramente más cortos que los productos de tipo salvaje, estaban presentes. Esto fue debido a formación de heterodúplex. Vía (1) =100 pb: marcador de tamaño, vía 5= -RT-PCR: control negativo.

Referencias (a la parte general, excluyendo ejemplos 2,5 y 6)

[0108]

1. Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., Kunkel, L. M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51, 919-928 .
2. Hoffman, E. P., Fischbeck, K. H., Brown, R. H., Johnson, M., Medori, R., Loike, J. D., Harris, J. B., Waterston, R., Brooke, M., Specht, L., et al. (1988) Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.*, 318, 1363-1368 .
3. Den Dunnen, J. T., Grootsholten, P. M., Bakker, E., Blondin, L. A., Ginjaar, H. B., Wapenaar, M. C., van Paassen, H. M., van Broeckhoven, C., Pearson, P. L., van Ommen, G. J. (1989) Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am. J. Hum. Genet.*, 45, 835-847 .
4. Koenig, M., Beggs, A. H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C. R., Lindlof, M., Kaariainen, H., et al. (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.*, 45, 498-506 .
5. Tuffery-Giraud, S., Chambert, S., Demaille, J., Claustres, M. (1999) Point mutations in the dystrophin gene: evidence for frequent use of cryptic splice sites as a result of splicing defects. *Hum. Mutat.*, 14, 359-368 .
6. Prior, T. W., Bartolo, C., Pearl, D. K., Papp, A. C., Snyder, P. J., Sedra, M. S., Burghes, A. H., Mendell, J. R. (1995) Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am. J. Hum. Genet.*, 57, 22-33 .
7. Moser, H. (1984) Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum. Genet.*, 66, 17-40 .
8. Emery, A. E. (2002) The muscular dystrophies. *Lancet*, 359, 687-695 .
9. Yoshida, M., Ozawa, E. (1990) Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J. Biochem. (Tokyo)*, 108, 748-752 .
10. Ervasti, J. M., Campbell, K. P. (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66, 1121-1131 .
11. Di Blasi, C., Morandi, L., Barresi, R., Blasevich, F., Cornelio, F., Mora, M. (1996) Dystrophin-associated protein abnormalities in dystrophin-deficient muscle fibers from symptomatic and asymptomatic Duchenne/Becker muscular dystrophy carriers. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 92, 369-377 .
12. Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G., Campbell, K. P. (1990) Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, 345, 315-319 .
13. Matsumura, K., Burghes, A. H., Mora, M., Tome, F. M., Morandi, L., Cornelio, F., Leturcq, F., Jeanpierre, M., Kaplan, J. C., Reinert, P., et al. (1994) Immunohistochemical analysis of dystrophin-associated proteins in Becker/Duchenne muscular dystrophy with huge in-frame deletions in the NH2-terminal and rod domains of dystrophin. *J. Clin. Invest.*, 93, 99-105 .
14. Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., Kunkel, L. M. (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, 2, 90-95 .
15. Clemens, P. R., Duncan, F. J. (2001) Progress in gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 1, 89-96 .
16. Khan, M. A. (1993) Corticosteroid therapy in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, 120, 8-14 .
17. De Angelis, F. G., Sthandier, O., Berarducci, B., Toso, S., Galluzzi, G., Ricci, E., Cossu, G., Bozzoni, I. (2002) Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9456-9461 .
18. Mann, C. J., Honeyman, K., Cheng, A. J., Ly, T., Lloyd, F., Fletcher, S., Morgan, J. E., Partridge, T. A., Wilton, S. D. (2001) Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 42-47 .
19. van Deutekom, J. C., Bremmer-Bout, M., Janson, A. A., Ginjaar, I. B., Baas, F., den Dunnen, J. T., van Ommen, G. J. (2001) Antisense-induced exons skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum.*

- Mol. Genet., 10, 1547-1554 .
20. Wilton, S. D., Lloyd, F., Carville, K., Fletcher, S., Honeyman, K., Agrawal, S., Kole, R. (1999) Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul. Disord.*, 9, 330-338 .
- 5 21. Dunckley, M. G., Manoharan, M., Villiet, P., Eperon, I. C., Dickson, G. (1998) Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1083-1090 .
22. Takeshima, Y., Wada, H., Yagi, M., Ishikawa, Y., Minami, R., Nakamura, H., Matsuo, M. (2001) Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. *Brain Dev.*, 23, 788-790 .
- 10 23. Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., Janson, A., den Dunnen, J., van Ommen, G., van Deutekom, J. (2002) Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.*, 12, S71 .
24. Shiga, N., Takeshima, Y., Sakamoto, H., Inoue, K., Yokota, Y., Yokoyama, M., Matsuo, M. (1997) Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.*, 100, 2204-2210 .
- 15 25. Cartegni, L., Chew, S. L., Krainer, A. R. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 285-298 .
26. Schaal, T. D., Maniatis, T. (1999) Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 261-273 .
- 20 27. Takeshima, Y., Nishio, H., Sakamoto, H., Nakamura, H., Matsuo, M. (1995) Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe. *J. Clin. Invest.*, 95, 515-520 .
28. Pramono, Z. A., Takeshima, Y., Alimsardjono, H., Ishii, A., Takeda, S., Matsuo, M. (1996) Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 445-449 .
- 25 29. Koenig, M., Monaco, A. P., Kunkel, L. M. (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53, 219-226 .
30. Den Dunnen, J. (1996) The Leiden Muscular Dystrophy pages; <http://www.dmd.nl> .
31. Mann, C. J., Honeyman, K., McClorey, G., Fletcher, S., Wilton, S. D. (2002) Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *J. Gene Med.*, 4, 644-654 .
- 30 32. Kerr, T. P., Sewry, C. A., Robb, S. A., Roberts, R. G. (2001) Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum. Genet.*, 109, 402-407 .
33. Klein, C. J., Coover, D. D., Bulman, D. E., Ray, P. N., Mendell, J. R., Burghes, A. H. (1992) Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers. *Am. J. Hum. Genet.*, 50, 950-959 .
- 35 34. Sherratt, T. G., Vulliamy, T., Dubowitz, V., Sewry, C. A., Strong, P. N. (1993) Exon skipping and translation in patients with frameshift deletions in the dystrophin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 53, 1007-1015 .
35. Lu, Q. L., Morris, G. E., Wilton, S. D., Ly, T., Artem'yeva, O. V., Strong, P., Partridge, T. A. (2000) Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J. Cell Biol.*, 148, 985-996 .
- 40 36. Nicholson, L. V., Johnson, M. A., Bushby, K. M., Gardner-Medwin, D. (1993) Functional significance of dystrophin positive fibres in Duchenne muscular dystrophy. *Arch. Dis. Child*, 68, 632-636 .
37. Vainzof, M., Passos-Bueno, M. R., Takata, R. I., Pavanello Rde, C., Zatz, M. (1993) Intrafamilial variability in dystrophin abundance correlated with difference in the severity of the phenotype. *J. Neurol. Sci.*, 119, 38-42 .
- 45 38. Singh, V., Sinha, S., Mishra, S., Chaturvedi, L. S., Pradhan, S., Mittal, R. D., Mittal, B. (1997) Proportion and pattern of dystrophin gene deletions in north Indian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Hum. Genet.*, 99, 206-208 .
39. Melacini, P., Fanin, M., Danieli, G. A., Fasoli, G., Villanova, C., Angelini, C., Vitiello, L., Miorelli, M., Buja, G. F., Mostacciolo, M. L., et al. (1993) Cardiac involvement in Becker muscular dystrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 22, 1927-1934 .
- 50 40. Melis, M. A., Cau, M., Muntoni, F., Mateddu, A., Galanello, R., Boccone, L., Deidda, F., Loi, D., Cao, A. (1998) Elevation of serum creatine kinase as the only manifestation of an intragenic deletion of the dystrophin gene in three unrelated families. *Europ. J. Paediatr. Neurol.*, 2, 255-261 .
41. Onengut, S., Kavaslar, G. N., Battaloglu, E., Serdaroglu, P., Deymeer, F., Ozdemir, C., Calafell, F., Tolun, A. (2000) Deletion pattern in the dystrophin gene in Turks and a comparison with Europeans and Indians. *Ann. Hum. Genet.*, 64, 33-40 .
- 55 42. Rosenberg, C., Navajas, L., Vagenas, D. F., Bakker, E., Vainzof, M., Passos-Bueno, M. R., Takata, R. I., Van Ommen, G. J., Zatz, M., Den Dunnen, J. T. (1998) Clinical diagnosis of heterozygous dystrophin gene deletions by fluorescence in situ hybridization. *Neuromuscul. Disord.*, 8, 447-452 .
43. Sertic, J., Barisic, N., Sostarko, M., Brzovic, Z., Stavljenic-Rukavina, A. (1997) Deletion screening of the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene in Croatian population. *Coll. Antropol.*, 21, 151-156 .
- 60 44. Rando, T. A., Blau, H. M. (1994) Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J. Cell Biol.*, 125, 1275-1287 .
45. Murry, C. E., Kay, M. A., Bartosek, T., Hauschka, S. D., Schwartz, S. M. (1996) Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J. Clin. Invest.*, 98, 2209-2217 .
- 65 46. Roest, P. A., van der Tuijn, A. C., Ginjaar, H. B., Hoeben, R. C., Hoger-Vorst, F. B., Bakker, E., den Dunnen, J. T., van Ommen, G. J. (1996) Application of in vitro Myo-differentiation of non-muscle cells to enhance gene expression and

facilitate analysis of muscle proteins. Neuromuscul. Disord., 6, 195-202 .

47. Havenga, M. J., Lemckert, A. A., Ophorst, O. J., van Meijer, M., Germeraad, W. T., Grimbergen, J., van Den Doel, M. A., Vogels, R., van Deutekom, J., Janson, A. A., et al. (2002) Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. J. Virol., 76, 4612-4620 .

5 48. Anderson, L. V., Davison, K. (1999) Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. Am. J. Pathol., 154, 1017-1022 .

49. Neugebauer, KM, et al., J Cell Biol 129:899-908 (1995) .

50. Tacke R and Manley JL, Proc Soc Exp Biol Med 220:59-63 (1999) .

51. Graveley BR et al., Curr Biol 9:R6-7 (1999) .

10 52. Misteli T et al., Nature 387:523-527 (1997) .

53. Gorman L, Suter D, Emerick V, et al. Stable alteration of pre mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:4929 4934 .

54. Suter D, Tomasini R, Reber U, et al. Double target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta thalassemic mutations. Hum Mol Genet 1999;8:2415 2423

15

Tabla 1.

Vista general de los grupos de pacientes, AON y cebadores usados en este estudio						
Pacientes	Mutaciones	exones escogidos	AON ^a	Cebadores ^b -RT	Sets ^b de PCR Primarias	Sets ^b de PCR Anidadas
DL 515.2	Delección exón 45-50	Exón 51	h51AON1	h53r	h41f-h53r	h42f-h52r
DL 363.2	Delección exón 45-54	Exón 44	h44AON1	h55r2	h42f-h55r2	h44f-h55r
50685.1	Delección exón 48-50	Exón 51	h51AON1	h53r	h46f-h53r	h47f-h52r
DL 589.2	Delección exón 51-55	Exón 50	h50AON1	h58r	h47f-h58r	h49f-h57r
53914.1	Delección exón 52	Exón 51	h51AON1	h55r	h49f-h55r	h50f-h54r
50423.1	"	Exón 53	h53AON1	"	"	"
	Mutación puntual Exón 49	Exón 49	h49AON1	h52r	h46f-h52r	h47f-h51r

^a Las secuencias de AON fueron publicadas previamente (23).

^b Las secuencias de cebadores están disponibles previa solicitud.

Tabla 2

Características de los AON usados para estudiar el salto diana de 15 Exones ^a DMD diferentes						
Nombre	Secuencia antisentido (5'-3')	Longitud (pb)	G/C%	U/C%	Salto Exón	Transcrito
h2AON 1	cccauuuugugaauuuuuuuuu	24	29	75	+	FM
h2AON 2	uugugcauuuacccaauuuugug	22	36	68	-	FM
h17AON1	ccauuacaguugucuguguu	20			+	
h17AON2	uaaucugccuucuuuuugg	20			+	
h29AON 1	uauccucugaauugcgauc	20	45	65	+	DM
h29AON 2	gguuauccucugaauugcgc	20	50	60	+	DM
h40AON 1	gagccuuuuuuuuuuuuug	19	37	79	+	DM
h40AON 2	uccuuucgucucugggcuc	19	58	79	+	DM
h41AON 1	cuccuuuuuuuuuuuuucgc	19	47	95	+	DM

h41AON 2	cuucgaaacugagcaaaauu	20	35	50	+	DM
h42AON 1	cuugugagacaugagug	17	47	41	+	DM
h42AON 2	cagagacuccucuugcuu	18	50	67	+	DM
h43AON 1	ugcugcugucuucuugcu	18	50	78,	-	FM
h43AON 2	uuguuaacuuuuuccauu	19	26	79	+	FM
h43AON5	cuguagcuucacccuuucc	19			+	
h44AON 1	cgccgccauuucucaacag	19	58	63	+	FM
h44AON 2	uuuguauuuagcauguuccc	20	35	70	+	FM
h45AON 1	gcugaauuauuuucucccc	19	42	74	-	FM
h45AON 5	gcccuaugccaucugg	17	65	58	+	FM
h46AON 4b	cugcuuccuccaacc	15	60	80	+	FM
h46AON 8b	gcuuuucuuuaguugcugc	20	40	75	+	FM
h46AON26:	agguucaagugggauacua	19	42	37	+	FM
h47AON 1	ucuugcucucugggcuu	18	50	78	-	DM
h47AON 2	cuugagcuuauuuucaaguuu	21	29	67	-	DM
h48AON 1	uuucuccuuguuucuc	16	38	94	-	DM
h48AON 2	ccaauuuuuccaacugauuc	21	33	62	-	DM
h48AON6	gcuucaauuucuccuuguu	19			+	
h48AON7	uuuauuugagcuucaauuu	19			+	
h49AON 1	cuuccacauccgguguuuu	19	47	74	+	DM
h49AON 2	guggcugguuuuuccuugu	19	47	68	+	DM
h50AON 1	cucagagcucagauuuu	17	47	59	+	FM
h50AON 2	ggcugcuuugcccuc	15	67	73	-	FM
h51AON 1	ucaaggaagauggcauuucu	20	40	45	+	FM
h51AON 2	ccucugugauuuuauaacuugau	23	30	65	+	FM
h53AON 1	cuguugccuccgguucug	18	61	72	+	FM
h53AON 2	uuggcucuggccuguccu	18	61	72	-	FM
h55AONI	cuguugcaguaaaucaugag	20			+	
h55AON6	gagucuucaggagccuu	13			+	
h59AON2	uugaaguuccuggagucuu	19			+	

^a Se probaron dos AON por exón. Sus diferentes longitudes y contenidos de G/C (%) no estaban correlacionados con su efectividad de salto de exón (1, salto inducido, 2, sin salto). Los AON fueron dirigidos a secuencias ricas en purina (A/G) tal y como se indica por su contenido de U/C (%) (antisentido). El salto de los exones Diana produjo transcritos tanto dentro del marco (DM) como fuera del marco (FM).

^b van Deutekom et al., 2001 [21].

Tabla 3

Sets de cebadores usados para el análisis RT-PCR para detectar el salto de exones escogidos ^a						
Exón diana	Cebador-RT	Set cebador primaria	PCR	Set cebador anidada	PCR	
2	h4r	h1f1-h4r		h1f2-h3r		
2	h9r	h1f1-h9r		h1f2-h8r		
29	h31r	h25f-h31r		h26f-h30r		

ES 2 452 293 T3

40	h44r	h38f-h44r	h39f-h43r
41	h44r	h38f-h44r	h39f-h43r
42	h44r	h38f-h44r	h39f-h43r
43	h47r	h41f-h47r	h42f-h46r
44	h47r	h41f-h47r	h42f-h46r
45	h47r	h41f-h47r	h42f-h46r
46	h48r	h44f-h48r	h45f-h47r
47	h52r	h44f-h52r	h46f-h51r
48	h52r	h44f-h52r	h46f-h51r
49	h52r	h44f-h52r	h46f-h51r
50	h52r	h44f-h52r	h46f-h51r
51	h53r	h47f-h53r	h49f-h52r
53	h55r	h50f-h55r	h51f-h54r

^a Las secuencias de cebadores están disponibles previa solicitud.

Tabla 4

Vista general y frecuencia de las mutaciones causantes de DMD de la Base de Datos Leiden DMD (LDMD), teóricamente corregibles mediante el salto de uno de los 12 exones satisfactoriamente escogidos como diana en este estudio					
Exón a saltar	Terapéutica para mutaciones DMD:				
	Deleciones (Exones)	% deleciones base de datos LDMD	Duplicados (Exones)	% duplicados Base de datos LDMD	Nº mutaciones sin sentido Base de datos LDMD
2	3-7, 3-19, 3-21	2.9	2	9.0	
29					5
40					1
41					4
42					0
43	44, 44-47, 44-49, 44-51	3.7	43	3.0	
44	5-43, 14-43, 19-43, 30-43, 35-43, 36-43, 40-43, 42-43, 45, 45-54	7.8	44	3.0	
46	21-45, 45, 47-54, 47-56	5.6			
49					1
50	51, 51-53, 51-55	5.2	50	3.0	
51	45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63	17.5	51	1.5	
53	10-52, 45-52, 46-52, 47-52, 48-52, 49-52, 50-52, 52	7.5			

Tabla 5.

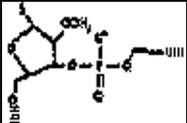
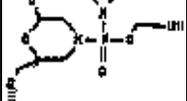
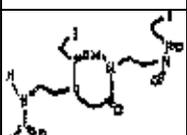
Vista general de los sets de pacientes, AON y cebadores usados en el ejemplo 3						
Pacientes	Mutaciones	exones escogidos	AON	Cebadores ^b RT	Sets ^b de cebador de PCR primaria	Sets ^b de cebador de PCR primaria anidada
DL 90.3	Mutación sin sentido Exón 43	Exón 43	h43AON2 ^a	h48r	h41f-h48r	h42f-h47r
DL470.2	Delección exón 46-50	Exón 44	h44AON1 ^a			
		Exón 45	h45AON5	h53r	h42f-h53r	h43-h52r
		Exón 51	h51AON2 ^a			
		Exón 45	U-linker	h53r	h42f-h53r	h43f-h52r
		Exón 51	AON ^c			

^a Secuencias separadas de AON fueron publicadas previamente [Aartsma-Rus, 2002].

^b Secuencias de cebadores disponibles previa solicitud.

^c AON de unión U consta de h45AON5 enlazada con h51AON2 mediante 10 uracilos.

Tabla 6

Tabla 1. Características de los análogos de AON usados en este estudio					
Esqueleto	Secuencia (5' a 3')	Carga	Longitud	TF Predicha ³	Monómero ³
ARN de 2'O-metil fosfotiorato (20MePS)	6-FAM-GCUUUUCUUUUAGUUGCUGC	Negativo	20 pb	44.9 °C	
ADN Morfolino-fosfordiamidato (morfolino)	6-FAM-GCTTTTCTTTTAGTTGCTGCTC (Unido a leash de ADN sentido para transfección con EPEI)	Sin carga	22 pb	~72-77 °C	
ADN Ácido nucleico bloqueado (LNA)	6-FAM-CTTTTAGTTGCTGC	Negativo	14 pb	131 °C	
Ácido péptidonucleico (PNA)	6-FAM-CTTTTAGTTGCTGC-(Lys) ₄	Positivo	14 pb	~61-66 °C	

^a TF es temperatura de fusión.

^b Estructura química del esqueleto. B es base (A, C, G, T, U)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para generar un oligonucleótido que comprende determinar, de una estructura secundaria de ARN de un exón, una región que se hibrida con otra parte de dicho ARN (estructura cerrada) y una región que no se hibrida en dicha estructura (estructura abierta), y posteriormente generar un oligonucleótido, del cual al menos tres nucleótidos consecutivos de dicho oligonucleótido son complementarios a dicha estructura cerrada y del cual al menos otros tres nucleótidos consecutivos de dicho oligonucleótido son complementarios a dicha estructura abierta y donde el gen de dicho ARN que comprende dicho exón es transcrito, codifica un gen de distrofia muscular de Duchenne (DMD), un gen de colágeno VI alfa 1 (COL6A1), un gen de miopatía miotubular 1 (MTM1), un gen de disferlina (DYSF), un gen de laminina alfa 2 (LAMA2), un gen de la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EMD) y/o un gen de calpaína 3 (CAPN3).
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde dichas estructuras cerradas y abiertas son adyacentes entre sí.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho oligonucleótido es complementario a una parte consecutiva de entre 14 y 50 nucleótidos de dicho ARN.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho oligonucleótido comprende ARN.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, donde dicho ARN contiene una modificación, preferiblemente una modificación de ribosa (ARN) o desoxirribosa (ADN) modificada con 2'-O-metilo.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el pre-ARNm que comprende dicho exón exhibe empalme no deseado en un sujeto.
- 35 7. Método según la reivindicación 6, donde la ausencia de dicho exón del ARNm producido a partir de dicho pre-ARNm, genera una región de codificación para una proteína.
- 40 8. Método según la reivindicación 6 o reivindicación 7, donde dicho gen es el gen de la distrofia muscular de Duchenne.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, donde dicho exón comprende los exones 2, 8, 9, 17, 19, 29, 40-46, 48-53, 55 o 59.
- 50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde un equivalente de dicho oligonucleótido es generado comprendiendo características similares de hibridación en tipo, no necesariamente en cantidad.
- 55 11. Método según la reivindicación 10, donde dicho equivalente comprende ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado y/o un morfolino fosforodiamidato o una combinación de los mismos.
- 60 12. Método según la reivindicación 11, donde dicho equivalente comprende ácido nucleico bloqueado.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el oligonucleótido o el equivalente del mismo, no se solapa con una secuencia de empalme donadora y/o una secuencia de empalme aceptora de dicho exón.
14. Método para producir un compuesto capaz de hibridarse al menos con dos exones en un pre-ARNm codificado por un gen, que comprende producir un compuesto que comprende al menos dos partes donde una primera parte comprende un oligonucleótido con al menos 8 nucleótidos consecutivos que son complementarios al primero de dichos dos exones y donde una segunda parte comprende un oligonucleótido con al menos 8 nucleótidos consecutivos que son complementarios a un segundo exón en dicho pre-ARNm, dicho compuesto que comprende entre 16 a 80 nucleótidos, donde dicho gen es un gen de la distrofia muscular de Duchenne, un gen de colágeno VI alfa 1 (COL6A1), un gen de miopatía miotubular 1 (MTM1), un gen de disferlina (DYSF), un gen de laminina alfa 2 (LAMA2), un gen de la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EMD) y/o un gen de calpaína 3 (CAPN3).
15. Método según la reivindicación 14, donde dicho primer y dicho segundo exón están separados en dicho pre-ARNm por al menos un exón al cual dicho oligonucleótido no es complementario.
16. Método según la reivindicación 14 o reivindicación 15, donde tramos de nucleótidos complementarios a dichos al menos dos exones están separados por una fracción de unión.
17. Método según la reivindicación 16, donde dicha fracción de unión comprende entre 4 y 40 nucleótidos, preferiblemente comprendiendo al menos 4 nucleótidos de uracilo.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, donde un equivalente de dicho compuesto se produce, preferiblemente un equivalente según la reivindicación 11.

Fig. 1

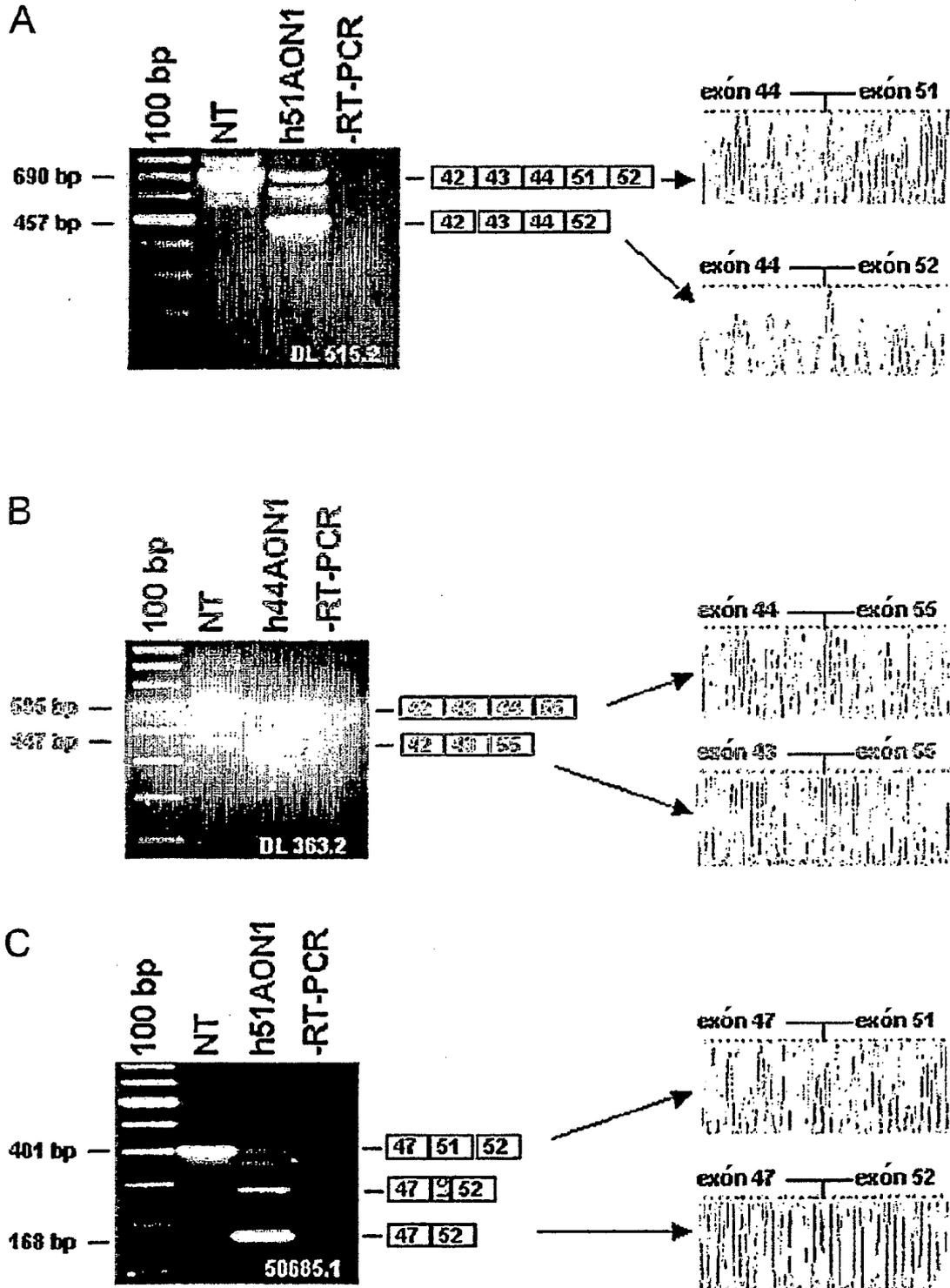
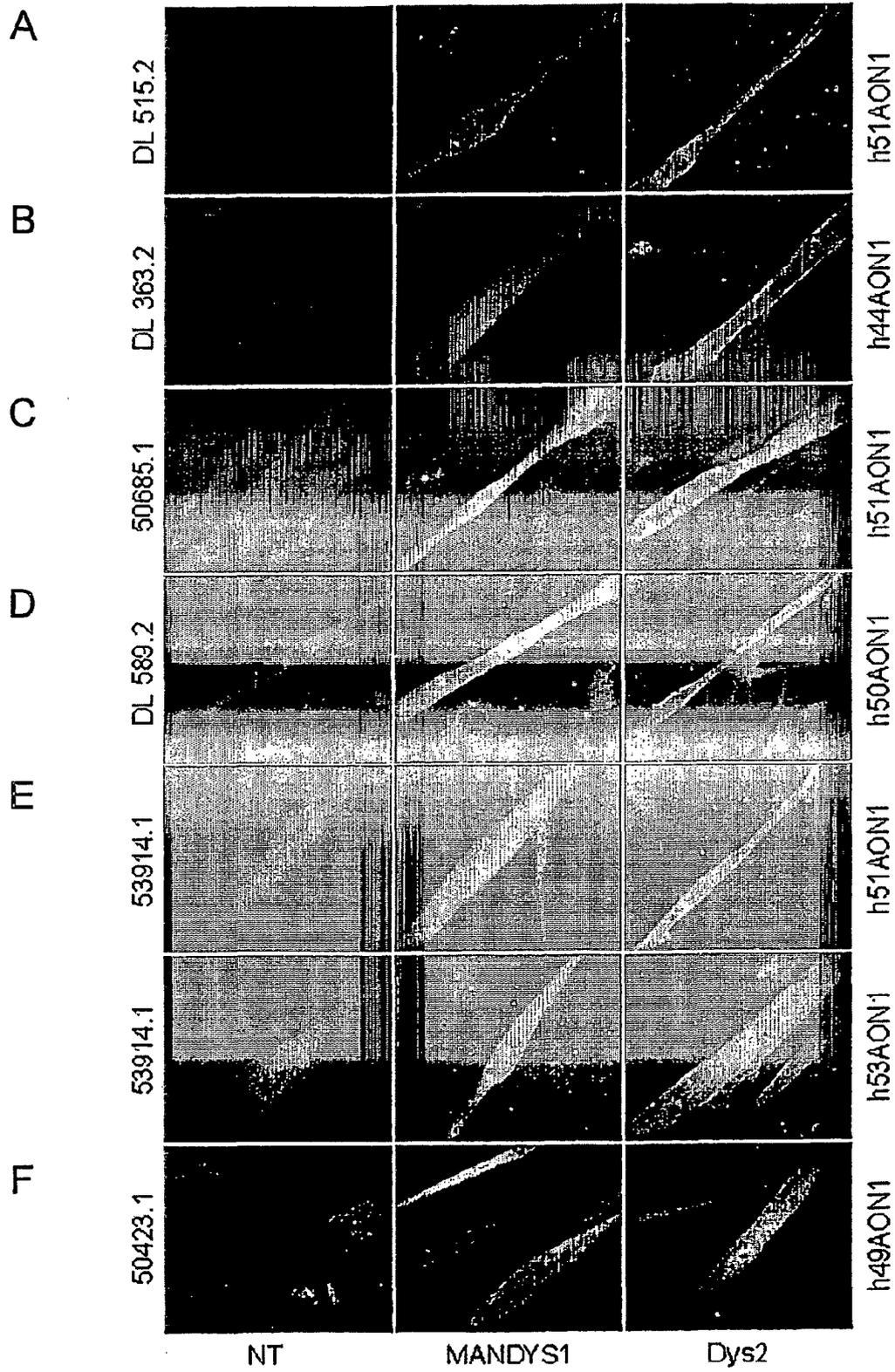


Fig. 2



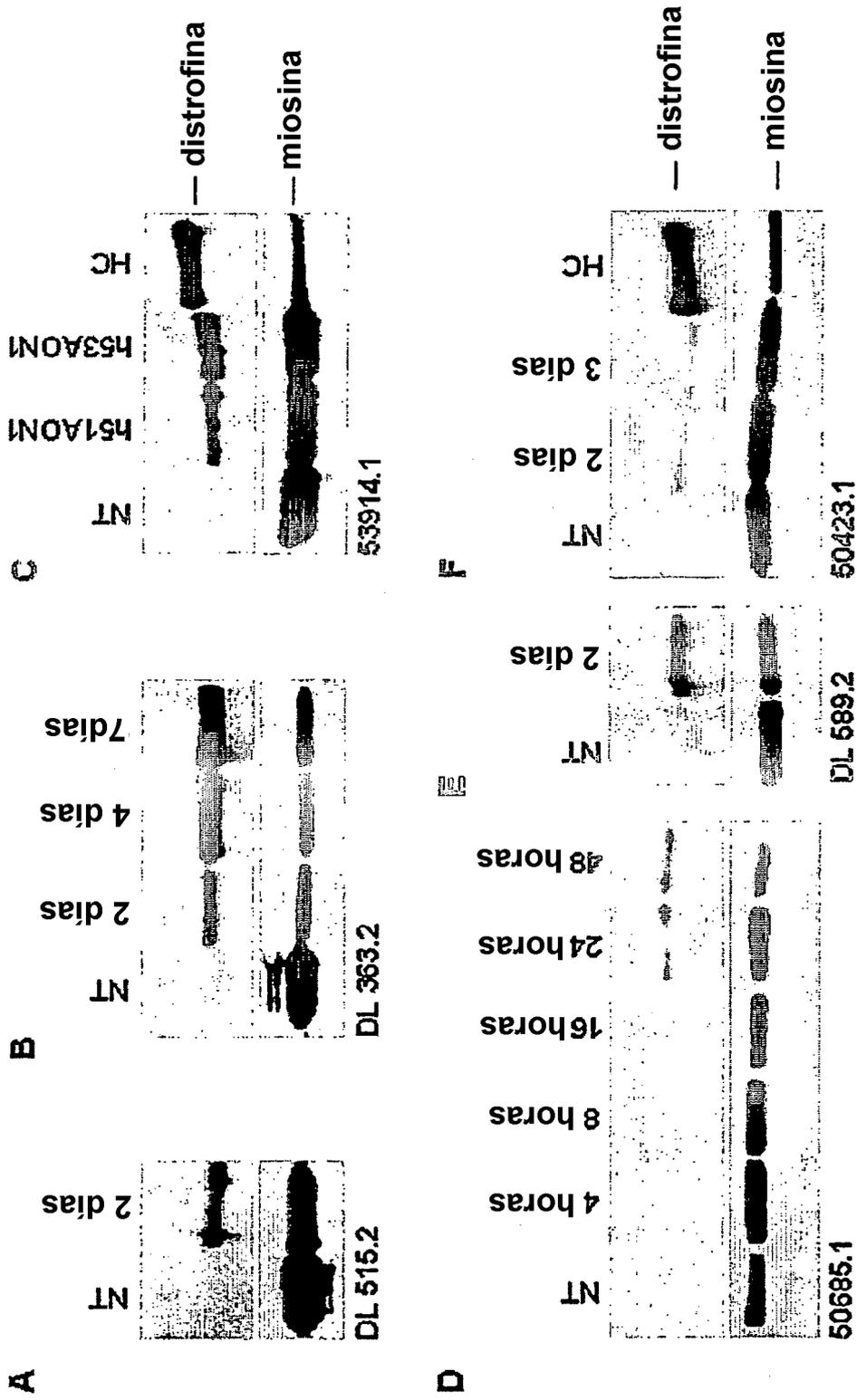


Fig. 3

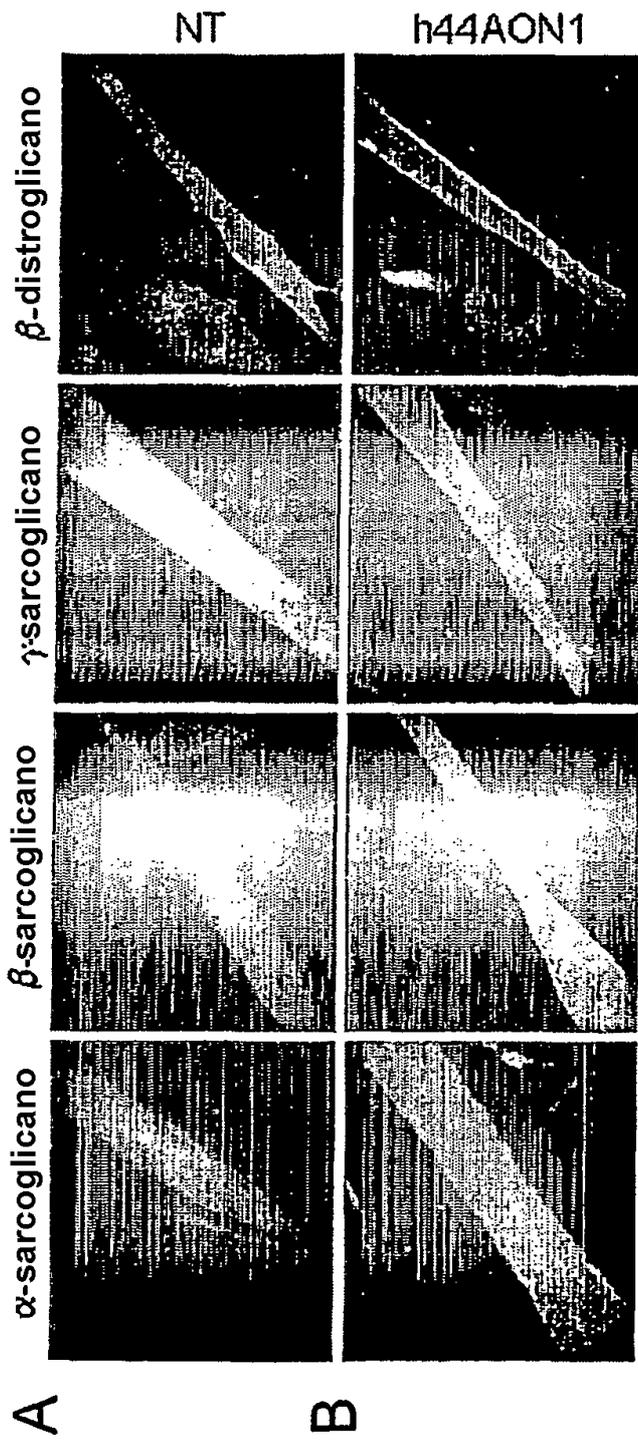


Fig. 4

Fig. 5

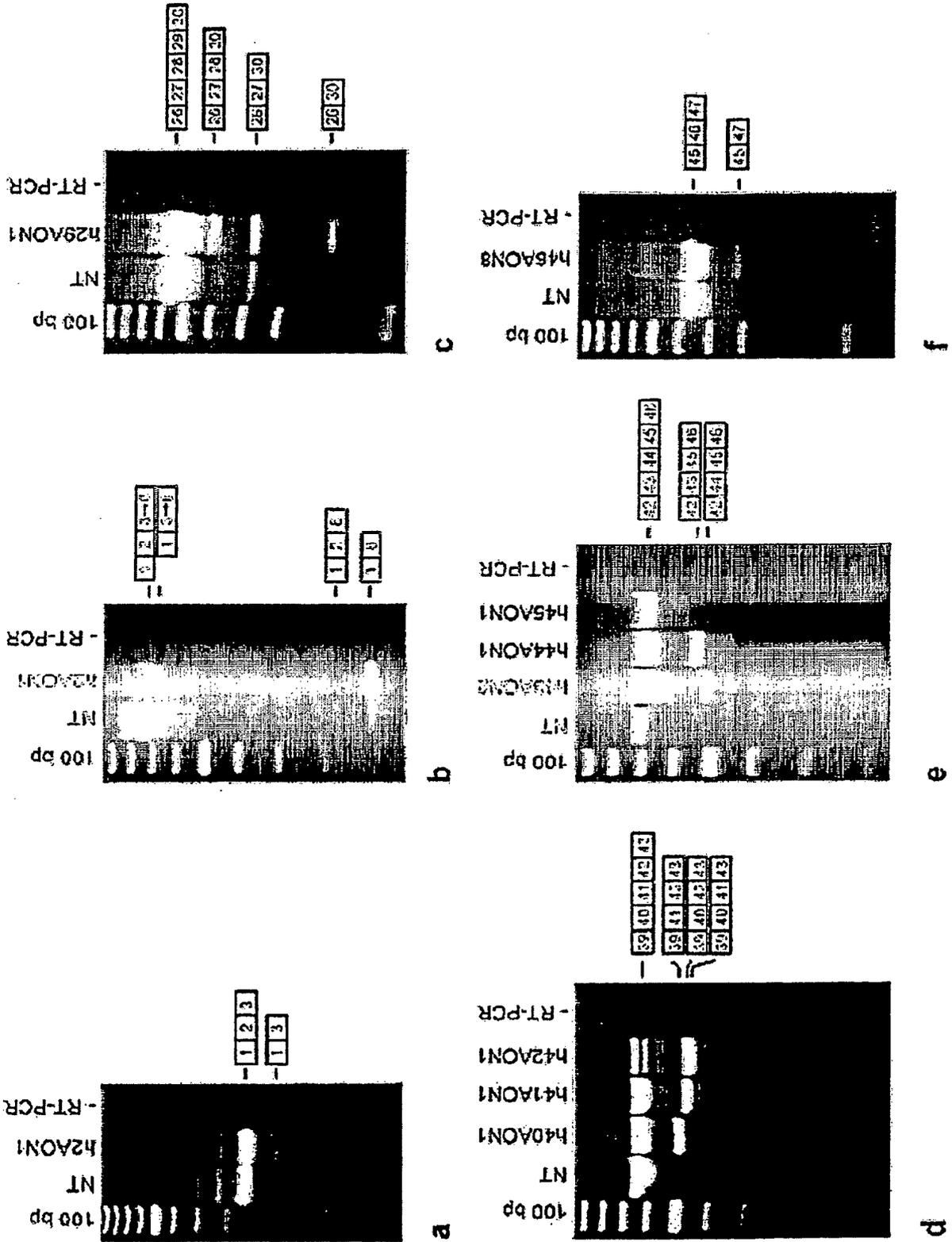


Fig. 5, continuación

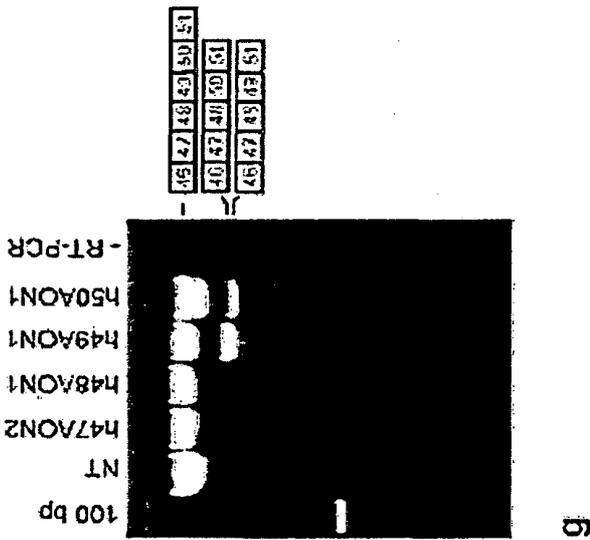
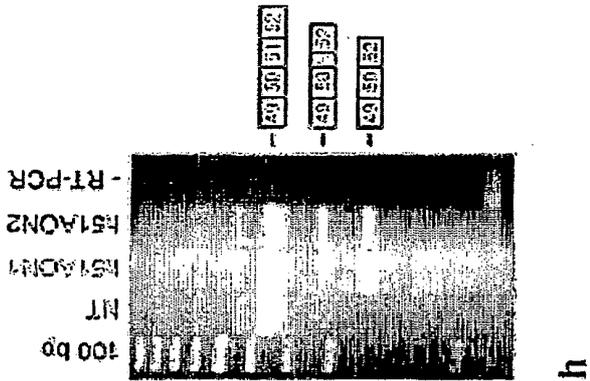
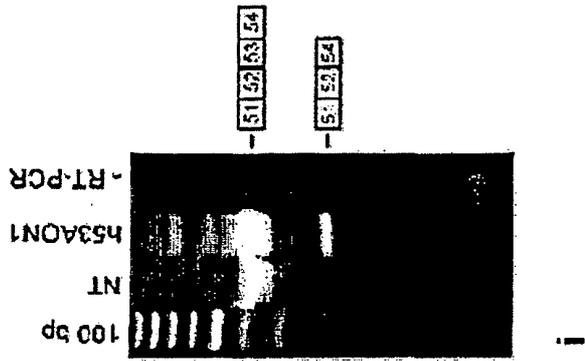


Fig. 6

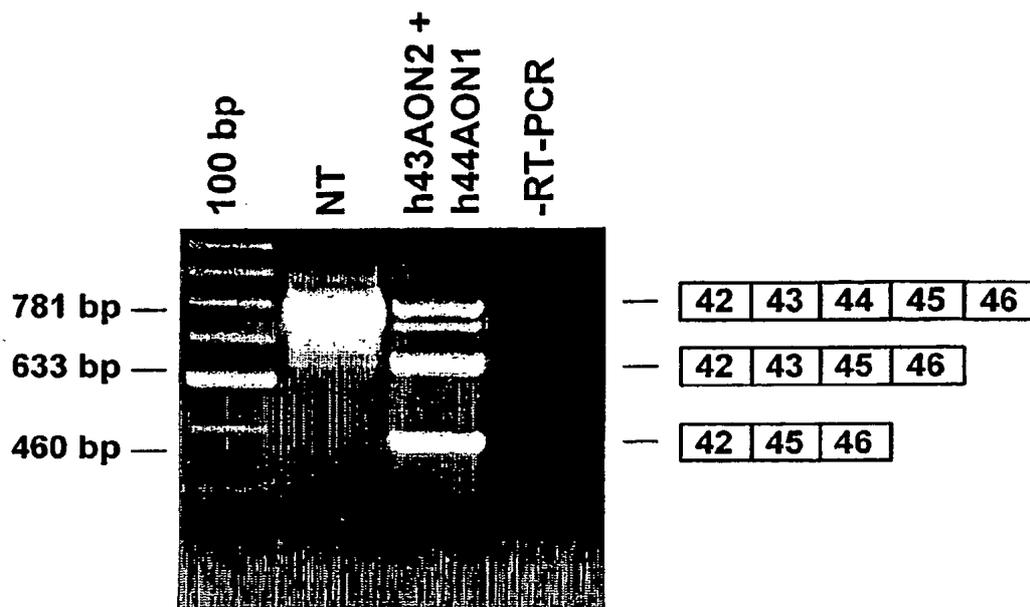




Fig. 7A

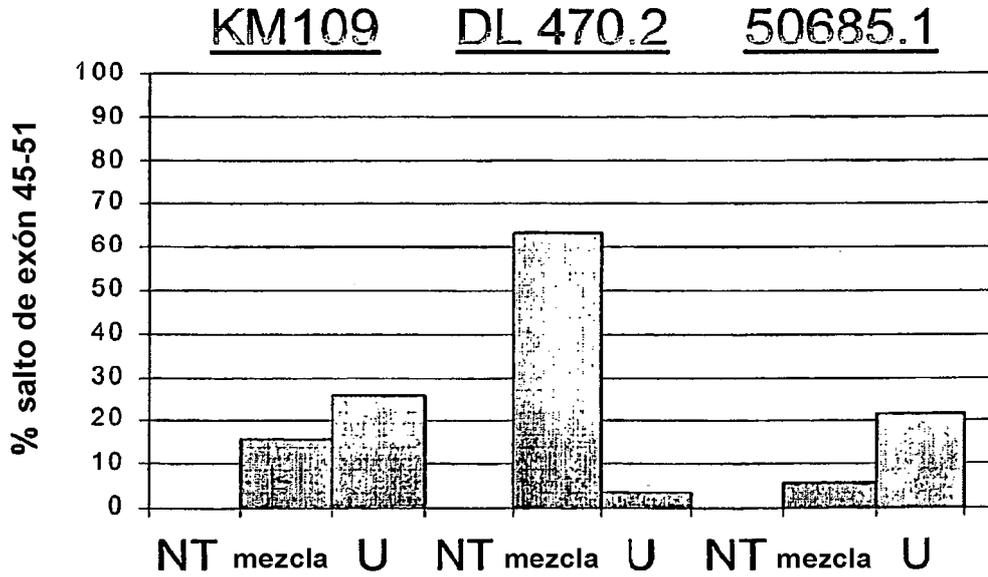


Fig. 7B

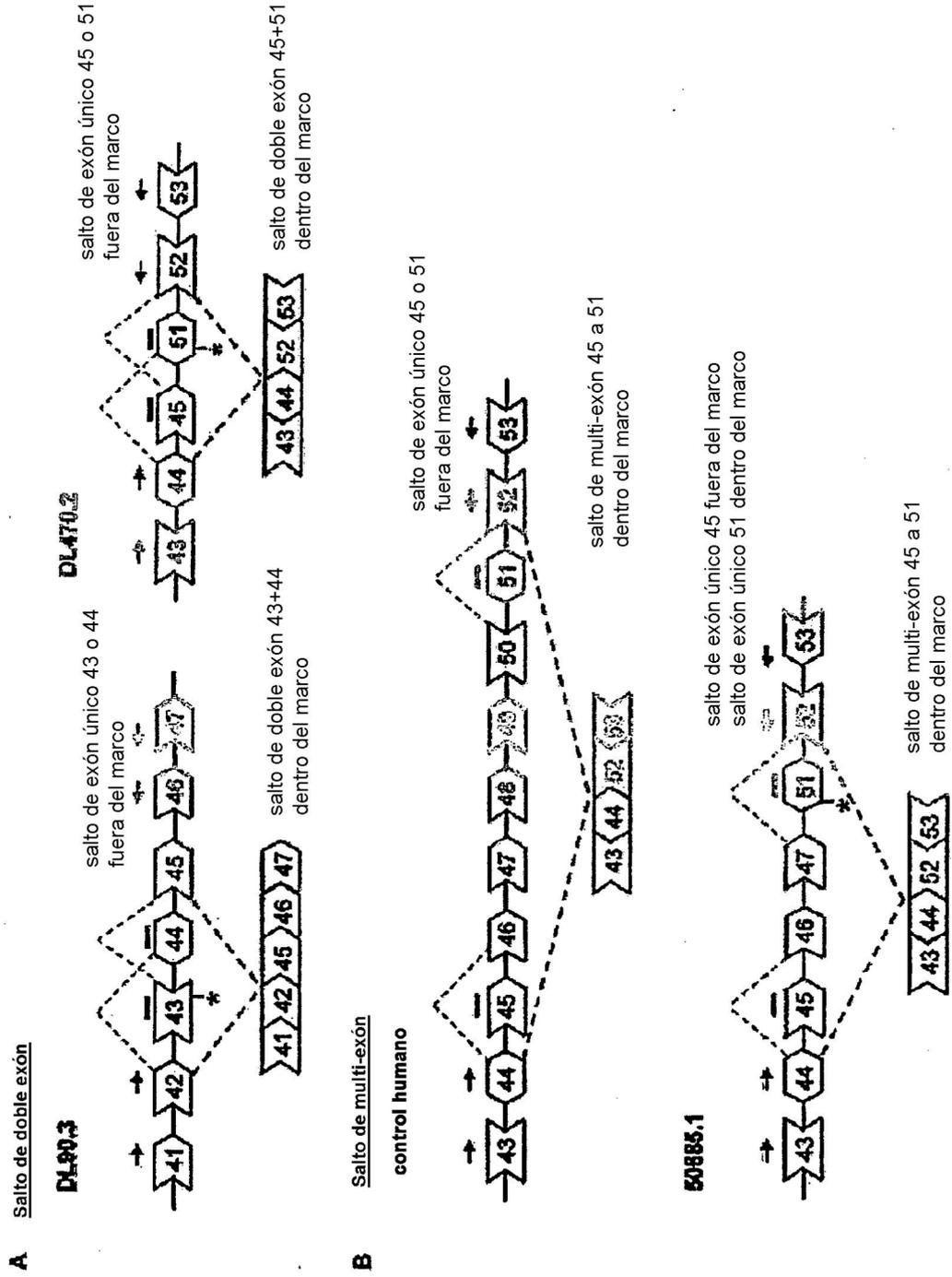


Fig. 8

Fig. 9

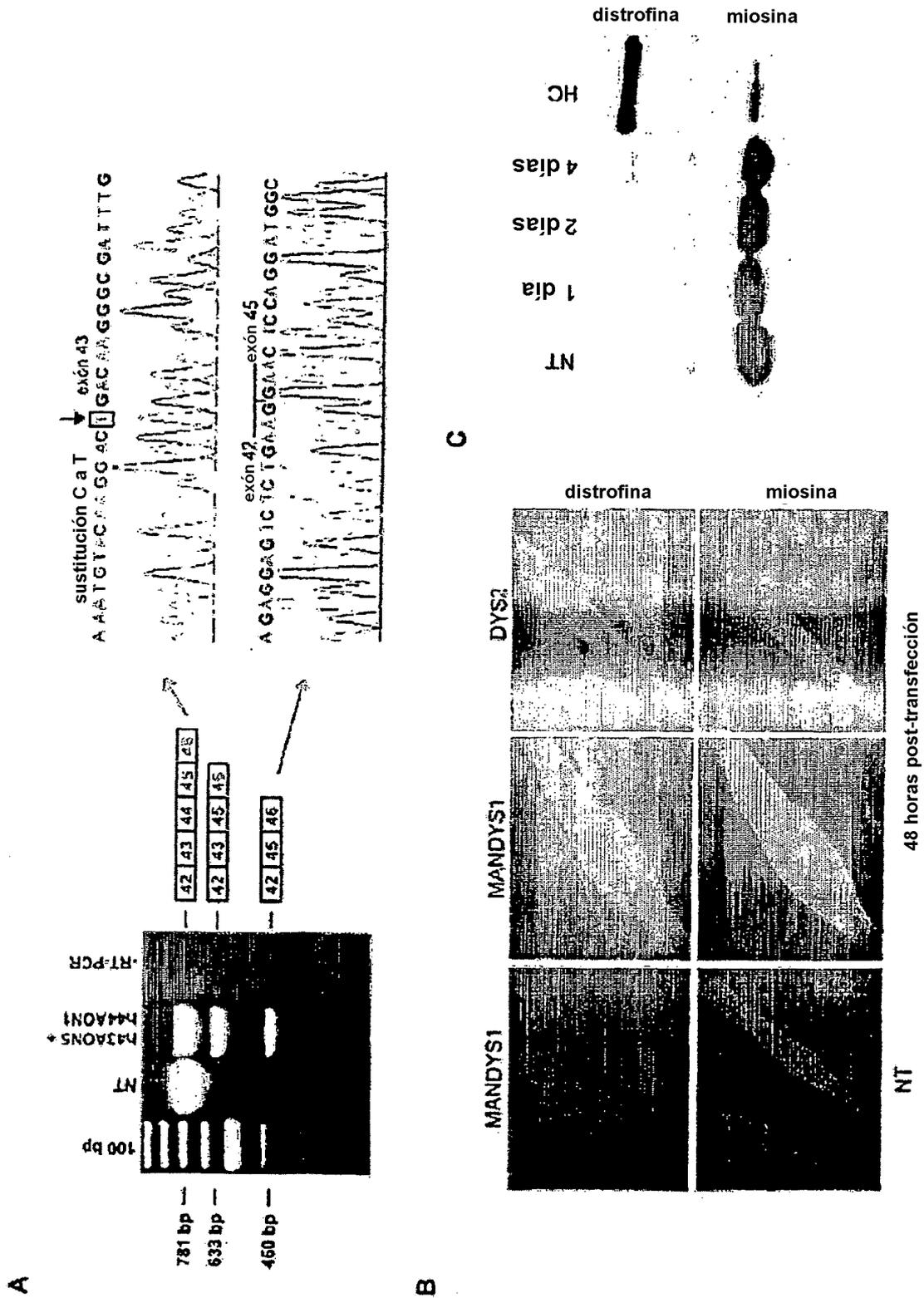


Fig. 10

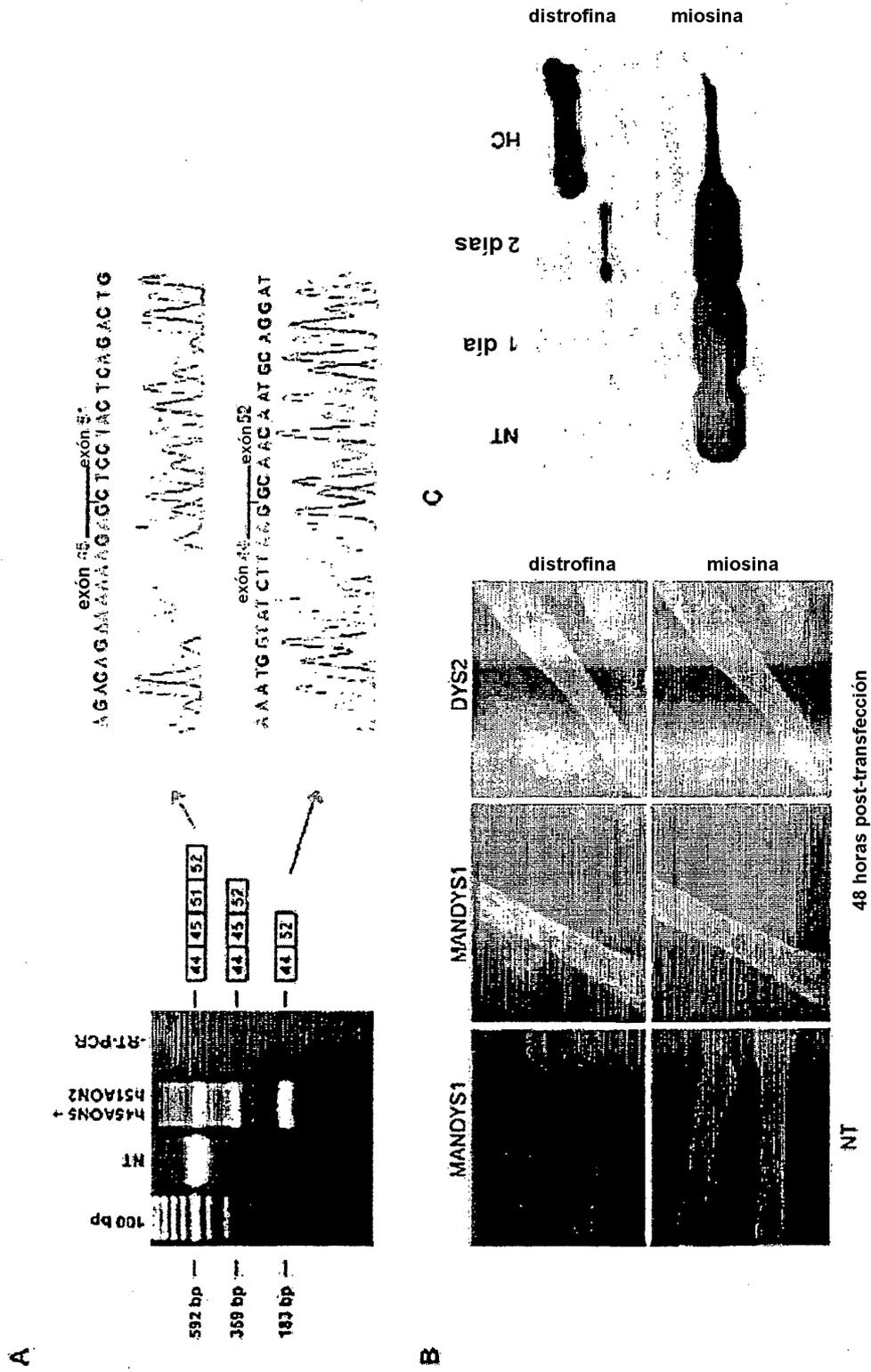
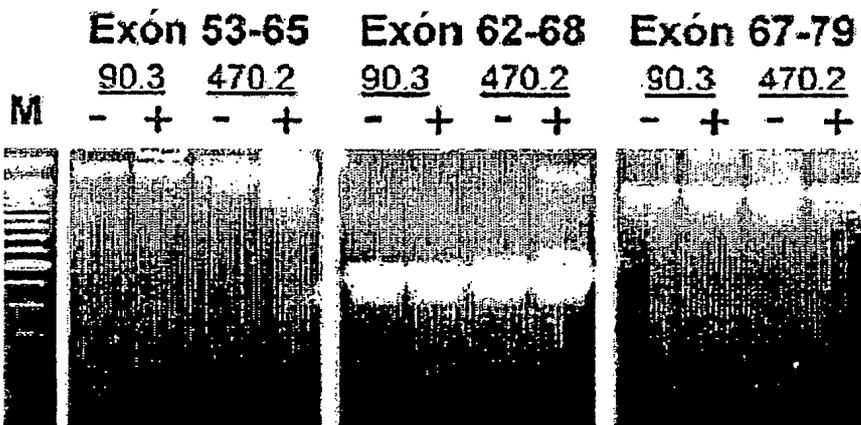
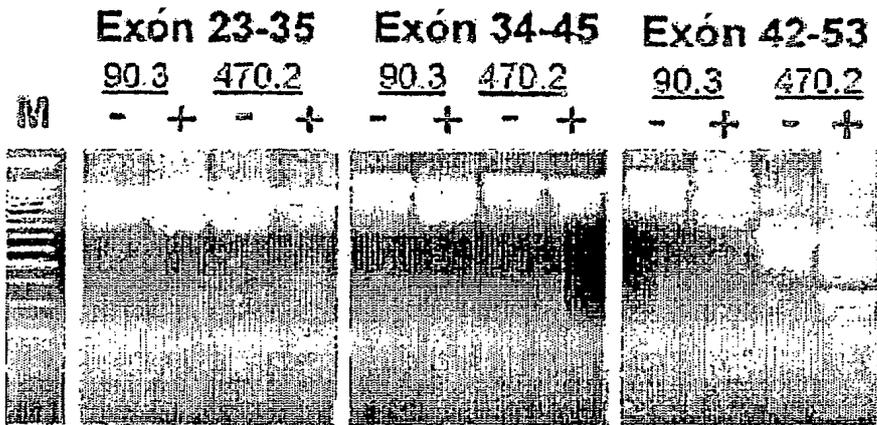
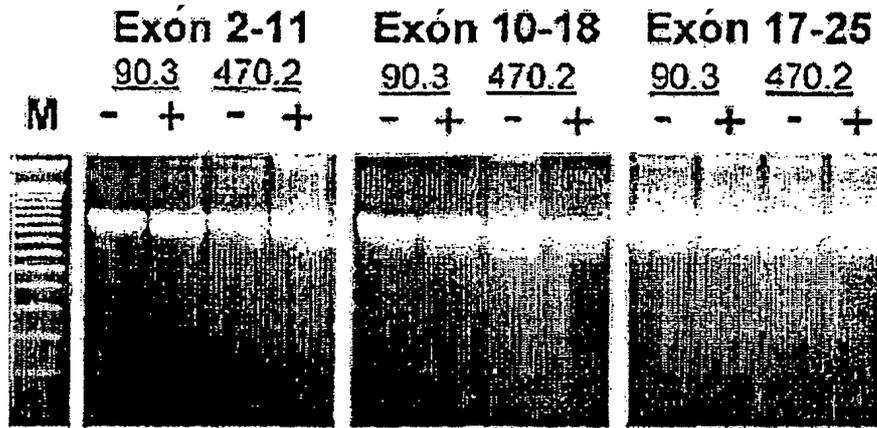


Fig. 11



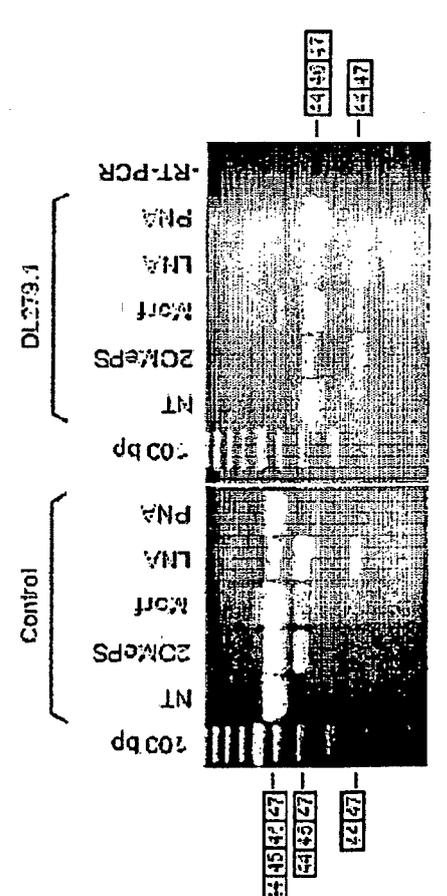
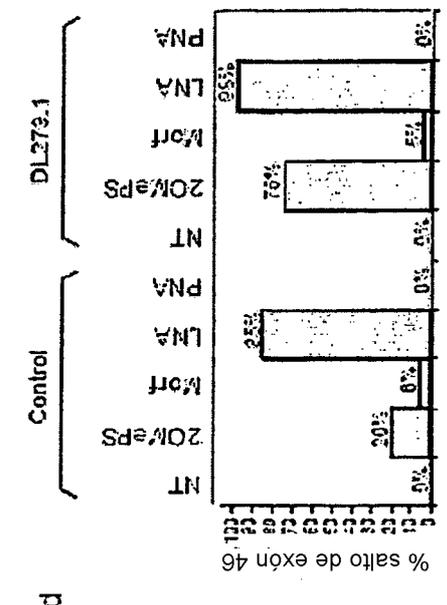
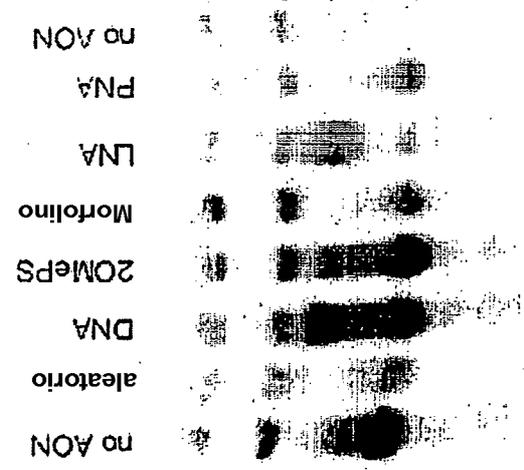
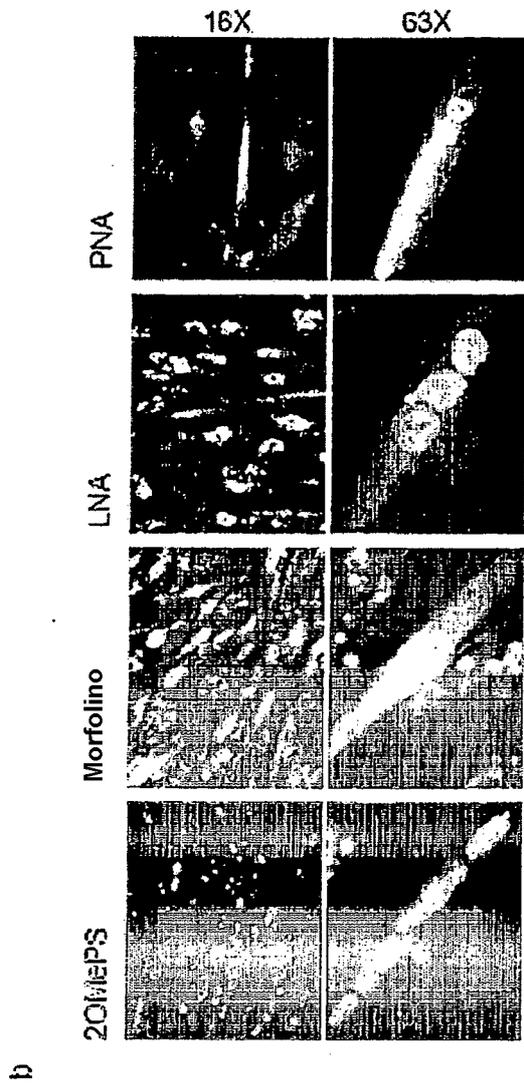


Fig. 13

Fig. 14

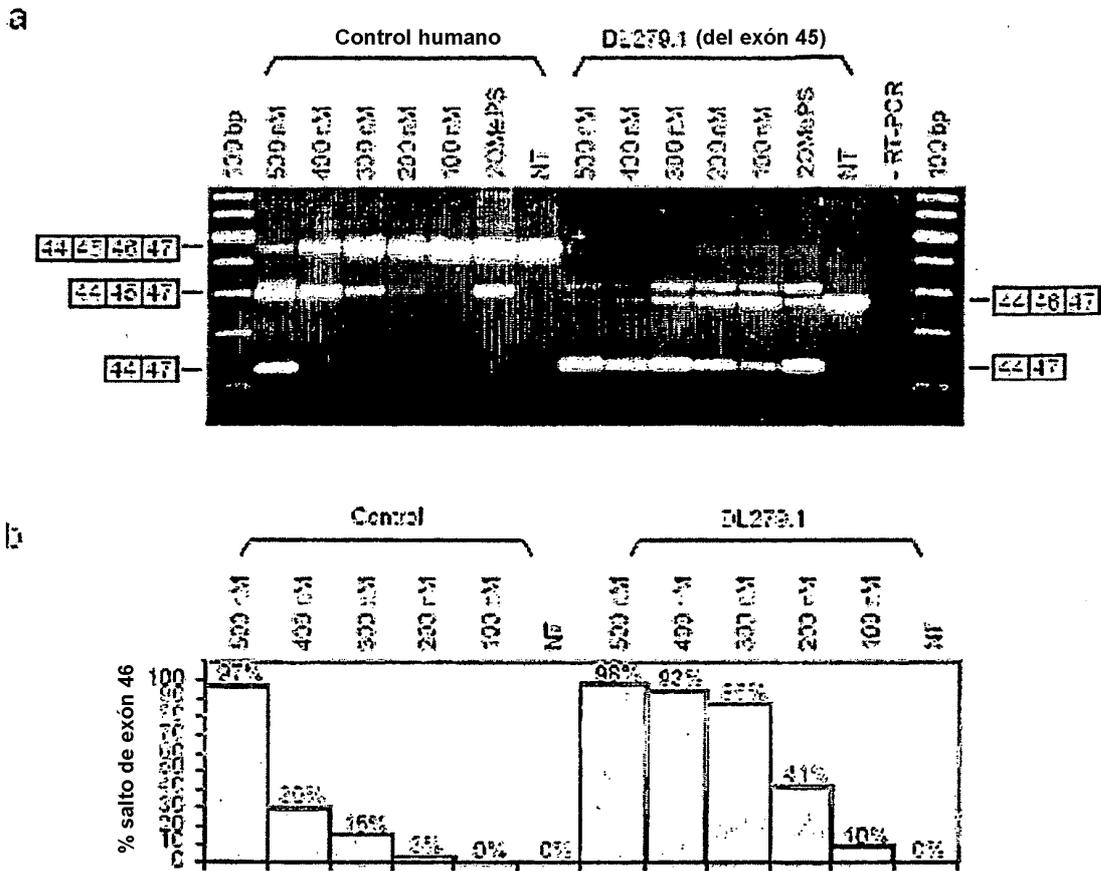


Fig. 16

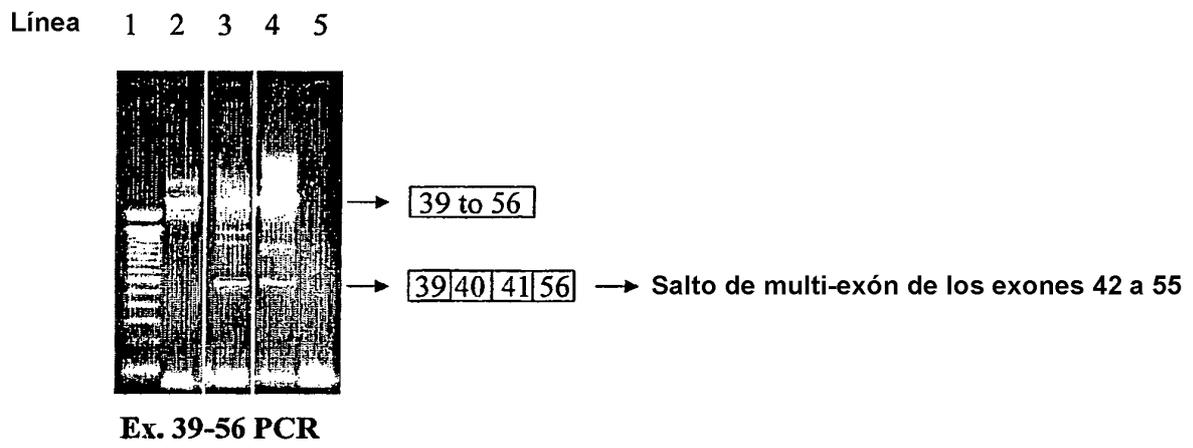
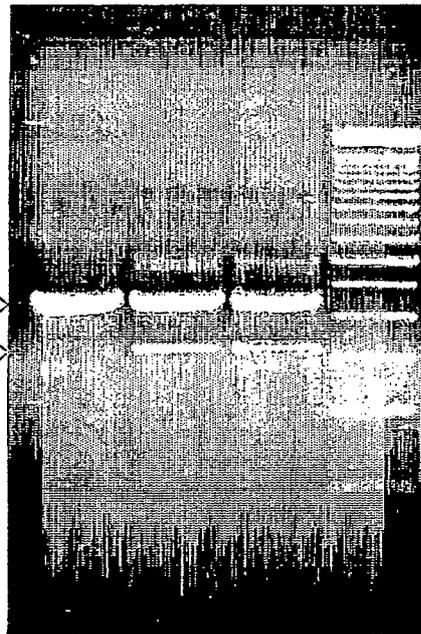


Fig. 17

rAAV
U7AON6

1 2 3

45	46	47
	45	47



C2C12 miotubos

Línea 1: No infectado (N.I).

Línea 2: MOI 5000

Línea 3: MOI 10000

Línea 4: Marcador