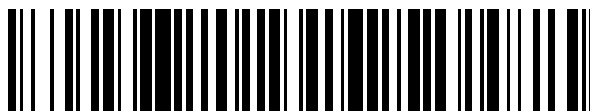


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 154**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2009 E 09746807 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2283134**

54 Título: **Procedimiento para la eficiente omisión del exón (44) en distrofia muscular de Duchenne y medios asociados**

30 Prioridad:

14.05.2008 EP 08156193
15.05.2008 US 128010 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2015

73 Titular/es:

PROSENSA TECHNOLOGIES B.V. (50.0%)
H. Oortweg 21
2333 CH Leiden, NL y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (50.0%)

72 Inventor/es:

PLATENBURG, GERARDUS JOHANNES;
DE KIMPE, JOSEPHUS JOHANNES;
VAN DEUTEKOM, JUDITH CHRISTINA
THEODORA;
VAN OMMEN, GARRIT-JAN BOUDEWIJN y
AARTSMA-RUS, ANNEMIEKE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 551 154 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

Procedimiento para la eficiente omisión del exón (44) en distrofia muscular de Duchenne y medios asociados

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la genética, más específicamente a la genética humana. La invención se refiere en particular a la modulación del corte y empalme del gen de la distrofia muscular de Duchenne humana.

Antecedentes

Las miopatías son trastornos que producen la alteración funcional de los músculos. La distrofia muscular (DM) se refiere a enfermedades genéticas que se caracterizan por debilidad y degeneración progresiva de músculos esqueléticos. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (DMB) son las formas de la infancia más comunes de distrofia muscular. Son trastornos recesivos y, debido a que el gen responsable de la DMD y la DMB reside sobre el cromosoma X, las mutaciones afectan principalmente a varones con una incidencia de aproximadamente 1 en cada 3500 chicos.

La DMD y la DMB se producen por defectos genéticos en el gen de DMD que codifica la distrofina, una proteína de músculo que se requiere para las interacciones entre el citoesqueleto y la matriz extracelular para mantener la estabilidad de la fibra muscular durante la contracción. La DMD es un trastorno neuromuscular letal grave que produce una dependencia de ayuda de silla de ruedas antes de la edad de 12 y los pacientes con DMD frecuentemente mueren antes de la edad de treinta debido a insuficiencia respiratoria o cardíaca. A diferencia, los pacientes con DMB frecuentemente siguen siendo ambulatorios a lo largo de su vida, y tienen esperanzas de vida casi normales. Las mutaciones de DMD en el gen distrofina se caracterizan por inserciones del marco de lectura o deleciones o mutaciones puntuales terminadoras, que producen la ausencia de distrofina funcional. Las mutaciones de DMB mantienen en general el marco de lectura intacto, permitiendo la síntesis de una distrofina parcialmente funcional.

Se han investigado varios tratamientos posibles durante los últimos 20 años, que incluyen trasplante de mioblastos, terapia génica dirigida a ADN y omisión de exones mediada por antisentido (van Deutekom y van Ommen, (2003), Nat. Rev. Genet., 4(10):774-83). La omisión de exones mediada por antisentido tiene como objetivo transformar mutaciones fuera del marco presentes en pacientes con DMD en mutaciones de tipo DMB en marco que producen la síntesis de una distrofina al menos parcialmente funcional, que prolongará la viabilidad de los músculos (Aartsma-Rus y van Ommen, (2007), ARN, 13(10): 1609-24).

La omisión de exones puede inducirse por oligonucleótidos antisentido (AON) dirigidos contra el sitio donante de corte y empalme o aceptor de corte y empalme de una unión de corte y empalme que participan en el procedimiento enzimático de la unión de exones, o contra secuencias internas del exón. En general, los sitios donantes de corte y empalme y aceptores de corte y empalme comprenden secuencias conservadas y el dirigir estas secuencias tiene el riesgo inevitable de co-dirigir sitios de corte y empalme de exones adicionales de DMD u otros transcritos de genes.

El exón 44 del gen de DMD consiste en 148 pares de bases. La omisión terapéutica del exón 44 restauraría el marco de lectura correcto en pacientes con DMD que tienen deleciones que incluyen, pero no se limitan a, los exones 03-43, 05-43, 06-43, 10-43, 13-43, 14-43, 17-43, 19-43, 28-43, 30-43, 31-43, 33-43, 34-43, 35-43, 36-43, 37-43, 38-43, 40-43, 41-43, 42-43, 43, 45, 45-54 y 45-68, o que tienen una duplicación del exón 44. Además, para algunos pacientes con DMD, las mutaciones son de forma que se requiere la omisión simultánea de uno o más exones, además de la omisión del exón 44 para restaurar el marco de lectura. Ejemplos no limitantes de tales mutaciones son mutaciones puntuales terminadoras en los exones flanqueantes 43 o 45, que requieren la omisión del exón 43+44 o la omisión del exón 44+45, respectivamente. Las mutaciones anteriormente mencionadas se producen en total en aproximadamente el 6-8% de todos los pacientes con DMD. La mayoría de las proteínas distrofina resultantes estarán truncadas en el dominio de varilla central de la proteína, dejando intactos el dominio de unión a actina del extremo N esencial y el extremo C dominio que se une a distrobrevina y sintrofina, y el dominio rico en cisteína del extremo C de unión a β -dystroglicano.

Descripción

La presente divulgación identifica cuatro regiones diferentes en el exón 44 que son particularmente adecuadas para inducir la omisión del exón 44. Así, la divulgación proporciona un procedimiento para modular el corte y empalme del exón 44 del gen de DMD en una célula, comprendiendo el procedimiento proveer dicha célula de una molécula que se une a una secuencia de nucleótidos que comprende SEC ID N°. 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU; SEC ID N°. 2: 5'-GGGAACAUGCUAAAUAC, SEC ID N°. 3: 5'-AGACACAAAUCCUGAGA o SEC ID N°. 4: 5'-CUGUUGAGAAA. Esta molécula se une preferentemente o es complementaria a cualquiera de SEC ID N°. 1, 2, 3 o 4 cuando SEC ID N°. 1, 2, 3 o 4 está presente dentro del exón 44 del pre-ARNm de DMD.

En toda la solicitud, la expresión "inducir la omisión" es sinónimo de "modular el corte y empalme".

Se encontró que una molécula que se une a una secuencia de nucleótidos que comprende SEC ID N°. 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU; SEC ID N°. 2: 5'-GGGAACAUGCUAAAAC, SEC ID N°. 3: 5'-AGACACAAAUCCUGAGA o SEC ID N°. 4: 5'-CUGUUGAGAAA produce la omisión altamente eficiente del exón 44 en células provistas de esta molécula. Además, ninguna de las secuencias indicadas se deriva de partes conservadas de sitios de unión del corte y empalme. Por tanto, probablemente dicha molécula no va a mediar en el corte y empalme diferencial de otros exones del pre-ARNm de DMD o exones de otros genes. Además, se evita preferentemente otra (inmuno)toxicidad evitando pares de CpG en la molécula que se une a una secuencia de nucleótidos como se define en el presente documento anteriormente.

Omisión de exones se refiere a la inducción en una célula de un ARNm maduro que no contiene un exón particular que normalmente está presente en ella. La omisión de exones se logra proveyendo una célula que expresa el pre-ARNm de dicho ARNm de una molécula que puede interferir con secuencias tales como, por ejemplo, la secuencia de donante de corte y empalme o de aceptor de corte y empalme requerida para permitir el procedimiento enzimático de corte y empalme, o que puede interferir con una señal de inclusión de exón requerida para el reconocimiento de una extensión de nucleótidos, ya que un exón va a incluirse en el ARNm. El término pre-ARNm se refiere a un ARNm precursor no procesado o parcialmente procesado que se sintetiza a partir de un molde de ADN en el núcleo celular por transcripción.

Ciertos procedimientos de la invención aliviarán una o más características de una célula miogénica o célula de músculo de un paciente con DMD que tiene delecciones que incluyen, pero no se limitan a, los exones 03-43, 05-43, 06-43, 10-43, 13-43, 14-43, 17-43, 19-43, 28-43, 30-43, 31-43, 33-43, 34-43, 35-43, 36-43, 37-43, 38-43, 40-43, 41-43, 42-43, 43, 45, 45-54 y 45-68, o que tienen una duplicación del exón 44. Además, la eliminación de un exón flanqueante, tal como, por ejemplo, el exón 43 o el exón 45, debido a una mutación puntual terminadora en el exón flanqueante, producirá una salida del transcrito del marco. La omisión del exón 44 adicional, en combinación con la omisión del exón flanqueante, restaurará el marco de lectura del gen de DMD en células miogénicas o células de músculo de pacientes con DMD. Ejemplos no limitantes de tales mutaciones son mutaciones puntuales terminadoras en los exones flanqueantes 43 o 45, que requieren la omisión del exón 43+44 o la omisión del exón 44+45, respectivamente.

En una realización, un procedimiento de la invención puede también aliviar una o más características de una célula miogénica o célula de músculo de un paciente con DMB fuerte a las características de un paciente con DMB débil. Las características de una célula de un paciente con DMD o DMB incluyen elevada captación de calcio por células de músculo, elevada síntesis de colágeno, morfología alterada, biosíntesis de lípidos alterada, elevado estrés oxidativo y/o sarcolema dañado. Realizaciones preferidas de un procedimiento de la invención se definen después en el presente documento.

En una realización según la divulgación, una molécula como se define en el presente documento puede ser una molécula de compuesto que se une y/o es complementaria a la secuencia especificada, o una proteína tal como una proteína de unión a ARN o una proteína de dedo de cinc no natural que ha sido modificada para ser capaz de unirse a la secuencia de nucleótidos indicada sobre una molécula de ARN. Procedimientos para cribar las moléculas de compuesto que se unen a secuencias de nucleótidos específicas se desvelan, por ejemplo, en el documento PCT/NL01/00697 y la patente de EE.UU. 6.875.736, que se incorporan en el presente documento por referencia. Los procedimientos para designar proteínas de dedo de cinc que se unen a ARN que se unen a secuencias de nucleótidos específicas se desvelan por Friesen y Darby, Nature Structural Biology 5: 543- 546 (1998), que se incorpora en el presente documento por referencia. La unión a una de la secuencia SEC ID N°: 1, 2, 3 o 4 especificada, preferentemente en el contexto del exón 44 de DMD, puede evaluarse mediante técnicas conocidas para el experto. Una técnica preferida según la divulgación es el ensayo de desplazamiento por movilidad del gel como se describe en el documento EP 1 619 249. En una realización preferida según la divulgación, se dice que una molécula se une a una de las secuencias especificadas tan pronto como una unión de dicha molécula a una secuencia marcada SEC ID N°: 1, 2, 3 o 4 sea detectable en un ensayo de desplazamiento por movilidad del gel. Alternativamente o en combinación con la realización previa, una molécula es un oligonucleótido que es complementario o sustancialmente complementario a la SEC ID N°: 1, 2, 3 o 4 o parte de la misma como se define después en el presente documento. El término "sustancialmente" complementario usado en este contexto indica que pueden permitirse uno o dos o más desapareamientos en tanto que la funcionalidad, es decir, la inducción de la omisión del exón 44, sea todavía aceptable.

La divulgación proporciona un procedimiento para diseñar una molécula, preferentemente un oligonucleótido capaz de inducir la omisión del exón 44 del gen de DMD. Primero, dicho oligonucleótido se selecciona para unirse a una de SEC ID N°: 1, 2, 3 o 4 o partes de las mismas como se ha definido antes en el presente documento. Posteriormente, en un procedimiento preferido de la divulgación al menos uno de los siguientes aspectos tiene que tenerse en cuenta para el diseño, mejorando dicha molécula adicionalmente:

- La molécula no contiene un CpG,
- La molécula no contiene un motivo de cuarteto de G,
- La molécula tiene cinética de unión a ARN aceptable y/o propiedades termodinámicas.

La presencia de un CpG en un oligonucleótido se asocia normalmente a una elevada inmunogenicidad de dicho oligonucleótido (Dorn y Kippenberger, Curr Opin Mol Ther 2008 10(1) 10-20). Esta elevada inmunogenicidad es no deseada, ya que puede inducir la rotura de fibras musculares. La inmunogenicidad puede evaluarse en un modelo animal evaluando la presencia de células CD4⁺ y/o CD8⁺ y/o la infiltración de mononucleocitos inflamatorios en biopsia de músculo de dicho animal. La inmunogenicidad también puede evaluarse en sangre de un animal o de un ser humano que está tratándose con un oligonucleótido de la invención detectando la presencia de un anticuerpo neutralizante y/o un anticuerpo que reconoce dicho oligonucleótido usando un inmunoensayo estándar conocido para el experto. Un aumento en la inmunogenicidad puede evaluarse detectando la presencia o una cantidad creciente de un anticuerpo neutralizante o un anticuerpo que reconoce dicho oligonucleótido usando un inmunoensayo estándar.

Un oligonucleótido que comprende un motivo de cuarteto de G tiene la tendencia de formar un cuádruplex, un multímero o agregado formado por el apareamiento de bases de Hoogsteen de cuatro oligonucleótidos monocatenarios (Cheng y Van Dyke, Gene. 1997 Sep 15;197(1-2):253-60), que es, por supuesto, no deseado: como resultado, se espera que disminuya la eficiencia del oligonucleótido. La multimerización o agregación se evalúa preferentemente por técnicas estándar de electroforesis en gel no desnaturizante de poliacrilamida conocidas para el experto. En una realización preferida, menos del 20% o 15%, 10%, 7%, 5% o menos de una cantidad total de un oligonucleótido de la divulgación tiene la capacidad para multimerizar o agregarse, evaluado usando el ensayo mencionado anteriormente.

La divulgación permite diseñar un oligonucleótido con cinética de unión a ARN aceptable y/o propiedades termodinámicas. La cinética de unión a ARN y/o las propiedades termodinámicas se determinan al menos en parte por la temperatura de fusión de un oligonucleótido (T_m ; calculada con el calculador de propiedades de oligonucleótidos (www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html) para ARN monocatenario usando la T_m básica y el modelo de vecino más próximo), y/o la energía libre del complejo de AON-exón diana (usando RNA structure versión 4.5). Si una T_m es demasiado alta, se espera que el oligonucleótido sea menos específico. Una T_m y energía libre aceptables dependen de la secuencia del oligonucleótido. Por tanto, es difícil dar intervalos preferidos para cada uno de estos parámetros. Una T_m aceptable puede oscilar entre 35 y 65 °C y una energía libre aceptable puede oscilar entre 15 y 45 kcal/mol.

Según la divulgación, el experto puede, por tanto, elegir primero un oligonucleótido como posible compuesto terapéutico que se une y/o que es complementario a SEC ID N°: 1, 2, 3 o 4 del exón 44 o partes del mismo como se define en el presente documento. El experto puede comprobar que dicho oligonucleótido puede unirse a dichas secuencias que se han definido anteriormente en el presente documento. Opcionalmente, en una segunda etapa, puede usar la invención para optimizar adicionalmente dicho oligonucleótido comprobando la ausencia de CpG, la ausencia de un motivo de cuarteto de G, y/u optimizando su T_m y/o libre energía del complejo de AON-diana. Puede intentar diseñar un oligonucleótido en el que no están presentes CpG y/o motivo de cuarteto de G y/o en el que una T_m y/o libre energía más aceptables se obtienen eligiendo una secuencia distinta del exón 44 (por ejemplo, SEC ID N°: 1, 2, 3 o 4) a la que el oligonucleótido es complementario. Alternativamente, si un oligonucleótido complementario a una extensión dada dentro de SEC ID N°: 1, 2, 3 o 4 del exón 44 comprende un CpG, un motivo de cuarteto de G y/o no tiene una T_m y/o energía libre aceptables, el experto puede mejorar cualquiera de estos parámetros disminuyendo la longitud del oligonucleótido, y/o eligiendo una extensión distinta dentro de cualquiera de SEC ID N°: 1, 2, 3 o 4 a la que el oligonucleótido es complementario y/o alterando la química del oligonucleótido.

Como un ejemplo, si se elige SEC ID N°: 1, se diseñaron varios oligonucleótidos que se encontró que se unían a esta secuencia: SEC ID N°: 5, 49 y 54. Se encontró que el oligonucleótido que comprende SEC ID N°: 5 tenía la cinética de unión a ARN y/o propiedades termodinámicas más óptimas, tales como la T_m más óptima. Cuando los presentes inventores probaron la funcionalidad de estos oligonucleótidos para inducir la omisión del exón 44, se confirmó que un oligonucleótido que comprendía SEC ID N°: 5 era el más eficiente de estos cuatro oligonucleótidos. Cada uno de estos oligonucleótidos es funcional en el sentido de la invención. Sin embargo, un oligonucleótido que comprende SEC ID N°: 5 es el oligonucleótido más preferido identificado que se une y/o es complementario a SEC ID N°: 1.

En cualquier etapa del procedimiento, un oligonucleótido de la divulgación es preferentemente un oligonucleótido que todavía puede presentar un nivel aceptable de una actividad funcional. Una actividad funcional de dicho oligonucleótido es preferentemente para inducir la omisión del exón 44 del gen de DMD un cierto grado, para proveer un individuo de una proteína distrofina funcional y/o ARNm y/o al menos en parte disminuir la producción de una proteína distrofina aberrante y/o ARNm. Cada una de estas características se define después en el presente documento. Tal actividad funcional puede medirse en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo o *in vitro* en una célula. La evaluación de la funcionalidad puede llevarse a cabo al nivel de ARNm, preferentemente usando RT-PCR. La evaluación de la funcionalidad puede llevarse a cabo al nivel de proteína, preferentemente usando análisis de transferencia Western o análisis de inmunofluorescencia de secciones transversales. En una realización preferida de la divulgación, se dice que un oligonucleótido induce la omisión del exón 44 de un gen de DMD cuando se prueba en una célula de músculo de un paciente con DMD, por RT-PCR, el porcentaje de omisión del exón 44 es de al menos el 30%, o al menos el 35%, o al menos el 40%, o al menos el 45%, o al menos el 50%, o al menos el 55%, o al menos el 60%, o al menos el 65%, o al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o el 100%.

En una realización preferida, tal oligonucleótido es preferentemente un medicamento. Más preferentemente, dicho medicamento es para prevenir o tratar distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en un individuo o un paciente. Como se define en el presente documento, un pre-ARNm de DMD significa preferentemente el pre-ARNm de un gen de DMD de un paciente con DMD o DMB. Un paciente pretende significar preferentemente un paciente que tiene DMD o DMB o un paciente susceptible a desarrollar DMD o DMB debido a sus antecedentes genéticos.

En el caso de un paciente con DMD, un oligonucleótido usado corregirá preferentemente al menos una de las mutaciones de DMD que están presentes en el gen de DMD de dicho paciente y, por tanto, crearán preferentemente una distrofina que se parecerá a la distrofina de DMB: dicha distrofina será preferentemente una distrofina funcional como se define después en el presente documento.

En el caso de un paciente con DMB, un oligonucleótido como se usa corregirá preferentemente al menos una de las mutaciones de DMB que están presentes en el gen de DMD de dicho paciente y, por tanto, crearán preferentemente una, o más de una, distrofina, que será más funcional que la distrofina que estuvo originalmente presente en dicho paciente con DMB. Incluso más preferentemente, dicho medicamento aumenta la producción de una proteína distrofina funcional o más funcional y/o ARNm y/o al menos en parte disminuye la producción de una proteína distrofina aberrante o menos funcional y/o ARNm en un individuo.

Preferentemente, un procedimiento de la invención aumenta la producción de una proteína distrofina más funcional y/o ARNm y/o disminuye la producción de una proteína distrofina aberrante o menos funcional y/o ARNm en un paciente, induciendo y/o promoviendo la omisión de al menos el exón 44 del pre-ARNm de DMD como se ha identificado en el presente documento en una o más células, preferentemente células de músculo de dicho paciente. El aumento de la producción de una proteína distrofina más funcional y/o ARNm y/o la disminución de la producción de una proteína distrofina aberrante y/o ARNm en un paciente normalmente se aplica en un paciente con DMD. El aumento de la producción de una distrofina más funcional o funcional y/o ARNm normalmente se aplica en un paciente con DMB.

Por tanto, un procedimiento preferido es un procedimiento en el que en un paciente o en una o más células de dicho paciente, la producción de una proteína distrofina más funcional o funcional y/o ARNm es elevada y/o la producción de una proteína distrofina aberrante y/o ARNm en dicho paciente es reducida, en el que el nivel de dicha proteína distrofina aberrante o más funcional y/o ARNm se evalúa por comparación con el nivel de dicha distrofina y/o ARNm en dicho paciente en la aparición del procedimiento.

Como se define en el presente documento, una distrofina funcional es preferentemente una distrofina no mutante correspondiente a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se identifica en SEC ID N°: 55. Una distrofina funcional es preferentemente una distrofina, que tiene un dominio de unión a actina en su parte del extremo N (primeros 240 aminoácidos en el extremo N), un dominio rico en cisteína (aminoácido 3361 hasta 3685) y un dominio del extremo C (últimos 325 aminoácidos en el extremo C), estando cada uno de estos dominios presentes en una distrofina no mutante como es conocido para el experto. Los aminoácidos indicados en el presente documento se corresponden con aminoácidos de la distrofina no mutante que se representan por SEC ID N°: 55. En otra realización, una distrofina funcional es una distrofina, que presenta al menos de algún modo una actividad de una distrofina no mutante. "Al menos de algún modo" significa preferentemente al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o el 100% de una actividad correspondiente de una distrofina funcional no mutante. En este contexto, una actividad de una distrofina no mutante es preferentemente la unión a actina y al complejo de glicoproteína asociado a distrofina (DGC) (Aartsma-Rus A y col., (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). La unión de distrofina a actina y al complejo de DGC puede visualizarse por tanto co-inmunoprecipitación usando extractos de proteína total como análisis de inmunofluorescencia de secciones transversales, de una biopsia de un músculo que se sospecha que es distrófico, como es conocido para el experto. Los individuos que padecen distrofia muscular de Duchenne normalmente tienen una mutación en el gen que codifica la distrofina que previene la síntesis de la proteína completa, es decir, una parada prematura previene la síntesis del extremo C de la proteína. En distrofia muscular de Becker, el gen distrofina también comprende una mutación en comparación con el no mutante, pero la mutación normalmente no incluye una parada prematura y el extremo C de la proteína normalmente se sintetiza. Como resultado, se sintetiza una proteína distrofina funcional que tiene al menos la misma actividad en tipo que una proteína natural, aunque no necesariamente la misma cantidad de actividad. En una realización preferida, una proteína distrofina funcional significa un gen de distrofina en marco. El genoma de un individuo con DMB normalmente codifica una proteína distrofina que comprende la parte del extremo N (primeros 240 aminoácidos en el extremo N), un dominio rico en cisteína (aminoácido 3361 hasta 3685) y un dominio del extremo C (últimos 325 aminoácidos en el extremo C), pero su dominio en forma de varilla central puede ser más corto que el de una distrofina no mutante (Aartsma-Rus A y col., (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). Los aminoácidos indicados en el presente documento se corresponden con aminoácidos de la distrofina no mutante que se representan por SEC ID N°: 55. La omisión de exones para el tratamiento de DMD se refiere preferentemente, pero no exclusivamente, a vencer una parada prematura en el pre-ARNm omitiendo un exón en el dominio con forma de dominio de varilla para corregir el marco de lectura y permitir la síntesis del resto de la proteína distrofina que incluye el extremo C, no obstante la proteína es

- algo más pequeña como resultado de un dominio de varilla más pequeño. En una realización preferida, un individuo que tiene DMD y que está tratándose usando un oligonucleótido como se define en el presente documento proporcionará una distrofina, que presenta al menos de algún modo una actividad de una distrofina no mutante. Más preferentemente, si dicho individuo es un paciente de Duchenne o se sospecha que es un paciente de Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina comparable en funcionalidad a una distrofina de un individuo que tiene DMB: preferentemente dicha distrofina puede interaccionar con tanto actina como el DGC, pero su dominio con forma de varilla central puede ser más corto que el de una distrofina no mutante (Aartsma-Rus A y col., (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). El dominio de varilla central de distrofina no mutante comprende 24 repeticiones tipo espectrina (Aartsma-Rus A y col., (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). Por ejemplo, un dominio con forma de varilla central de una distrofina como se proporciona en el presente documento puede comprender 5 a 23, 10 a 22 o 12 a 18 repeticiones tipo espectrina en tanto que pueda unirse a actina y a DGC.
- La disminución de la producción de una distrofina aberrante en dicho paciente o en una célula de dicho paciente puede evaluarse al nivel de ARNm y preferentemente significa que el 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos de la cantidad inicial de ARNm de distrofina aberrante es todavía detectable por RT-PCR. Un ARNm de distrofina aberrante o proteína también se denomina en el presente documento un ARNm de distrofina o proteína no funcional o menos de no funcional o semi-funcional. Un distrofina de pre-ARNm no funcional conduce preferentemente a una proteína distrofina fuera de marco, que significa que no se producirá y/o detectará proteína distrofina. Una proteína distrofina no funcional es preferentemente una proteína distrofina que no es capaz de unirse a actina y/o miembros del complejo de DGC-proteína. Una proteína distrofina no funcional o ARNm de distrofina normalmente no tiene, o no codifica, una proteína distrofina con un extremo C intacto de la proteína.
- El aumento de la producción de una distrofina funcional en un paciente o en una célula de dicho paciente puede evaluarse al nivel de ARNm (por análisis por RT-PCR) y preferentemente significa que una cantidad detectable de un ARNm de distrofina funcional o en marco es detectable por RT-PCR. En otra realización, el 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del ARNm de distrofina detectable es un ARNm de distrofina funcional o en marco.
- El aumento de la producción de una distrofina funcional en un paciente o en una célula de dicho paciente puede evaluarse al nivel de proteína (por análisis de inmunofluorescencia y de transferencia Western) y preferentemente significa que una cantidad detectable de una proteína distrofina funcional es detectable por análisis de inmunofluorescencia o transferencia Western. En otra realización, el 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la proteína distrofina detectable es una proteína distrofina funcional.
- Un aumento o una disminución se evalúa preferentemente en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo o un paciente por comparación con la cantidad presente en dicho individuo o paciente antes del tratamiento con dicha molécula o composición de la invención. Alternativamente, la comparación puede hacerse con un tejido muscular o célula de dicho individuo o paciente, que todavía no ha sido tratado con dicho oligonucleótido o composición en caso de que el tratamiento sea local.
- En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para aliviar uno o más síntomas de la distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en un individuo o aliviar una o más características de una célula miogénica o de músculo de dicho individuo, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho individuo un oligonucleótido o una composición como se define en el presente documento.
- Adicionalmente se proporciona un procedimiento para potenciar, inducir o promover la omisión de un exón de un pre-ARNm de distrofina en una célula que expresa dicho pre-ARNm en un individuo que padece distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho individuo un oligonucleótido o una composición como se define en el presente documento.
- Adicionalmente se proporciona un procedimiento para aumentar la producción de una proteína distrofina funcional y/o disminuir la producción de una proteína distrofina aberrante en una célula, comprendiendo dicha célula un pre-ARNm de un gen distrofina que codifica una proteína distrofina aberrante, comprendiendo el procedimiento proveer dicha célula de un oligonucleótido o composición de la invención y permitir la traducción del ARNm producido a partir del corte y empalme de dicho pre-ARNm. En una realización, dicho procedimiento se realiza *in vivo*, por ejemplo, usando un cultivo celular. Preferentemente, dicho procedimiento es *in vivo* en dicho individuo.
- En este contexto, el aumento de la producción de una proteína distrofina funcional se ha definido en el presente documento.
- El alivio de uno o más síntomas de la distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en un individuo usando una molécula o una composición de la invención puede evaluarse por cualquiera de los siguientes ensayos: prolongación del tiempo hasta la pérdida del caminar, mejora de la resistencia muscular, mejora de la capacidad para levantar peso, mejora del tiempo necesario para levantarse del suelo, mejora en el tiempo de caminar nueve

metros, mejora en el tiempo necesario para subir cuatro escalones, mejora del grado de la función de las piernas, mejora de la función pulmonar, mejora de la función cardíaca, mejora de la calidad de vida. Cada uno de estos ensayos es conocido para el experto. Como ejemplo, la publicación de Manzur y col. (Manzur AY y col., (2008), Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy (review), Wiley publishers, The Cochrane collaboration) da una amplia explicación de cada uno de estos ensayos. Para cada uno de estos ensayos, tan pronto como se encuentra una mejora detectable o prolongación de un parámetro medido en un ensayo, preferentemente significará que se han aliviado uno o más síntomas de la distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en un individuo usando una molécula o composición de la invención. La mejora detectable o prolongación es preferentemente una mejora estadísticamente significativa o prolongación como se describe en Hodgetts y col., (Hodgetts S., y col., (2006), Neuromuscular Disorders, 16: 591-602).

Alternativamente, el alivio de uno o más síntomas de la distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker puede evaluarse midiendo una mejora de una característica de una fibra muscular referente a su función, integridad y/o supervivencia, siendo dicha característica evaluada en el propio paciente. Tales características pueden evaluarse al nivel celular, de tejido de un paciente dado. Un alivio de una o más características puede evaluarse por cualquiera de los siguiente ensayos en una célula miogénica o célula de músculo de un paciente: reducida captación de calcio por células de músculo, disminución de la síntesis de colágeno, alteración de la morfología, alteración de la biosíntesis de lípidos, disminución del estrés oxidativo, y/o función, integridad y/o supervivencia mejoradas de la fibra muscular. Estos parámetros se evalúan normalmente usando análisis de inmunofluorescencia y/o histoquímicos de secciones transversales de biopsias de músculo.

Un oligonucleótido como se usa en el presente documento preferentemente comprende un oligonucleótido antisentido u oligorribonucleótido antisentido. En una realización preferida, se aplica una técnica de omisión de exones. La omisión de exones interfiere con los procedimientos naturales de corte y empalme que se producen dentro de una célula eucariota. En eucariotas superiores, la información genética para proteínas en el ADN de la célula está codificada en exones que se separan entre sí por secuencias intrónicas. Estos intrones son en algunos casos muy largos. La maquinaria de transcripción de eucariotas genera un pre-ARNm que contiene tanto exones como intrones, mientras que la maquinaria de corte y empalme, frecuentemente ya durante la producción del pre-ARNm, genera la actual región codificante para la proteína por corte y empalme junto con los exones presentes en el pre-ARNm.

La omisión de exones produce ARNm maduro que carece de al menos un exón omitido. Así, cuando dichos aminoácidos codifican exones, la omisión de exones conduce a la expresión de un producto alterado. La tecnología para la omisión de exones está actualmente dirigida hacia el uso de oligonucleótidos antisentido (AON). Una gran parte de este trabajo se hace en el modelo de ratón *mdx* para distrofia muscular de Duchenne. El ratón *mdx* lleva una mutación terminadora en el exón 23. A pesar de la mutación *mdx*, que debe descartar la síntesis de una proteína distrofina funcional, rara, se han observado fibras positivas para distrofina que existe de forma natural en tejido de músculo *mdx*. Se cree que estas fibras positivas para distrofina han surgido a partir de un mecanismo de omisión de exones que aparentemente existen de forma natural, tanto debido a mutaciones somáticas como mediante corte y empalme alternativo. Se ha mostrado que los AON dirigidos a, respectivamente, los sitios de corte y empalmen de 3' y/o 5' de los intrones 22 y 23 en pre-ARNm de distrofina interfieren con factores normalmente implicados en la eliminación del intrón 23, de manera que también se eliminó el exón 23 del ARNm (Alter J, y col., Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. Nat Med 2006;12(2):175-7, Lu QL, y col. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. Nat Med 2003;6:6, Lu QL, y col. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102(1):198-203, Mann CJ, y col., Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. J Gene Med 2002;4(6):644-54 o Graham IR, y col., Towards a therapeutic inhibition of dystrophin exon 23 splicing in mdx mouse muscle induced by antisense oligoribonucleotides (splicomers): target sequence optimisation using oligonucleotide arrays. J Gene Med 2004;6(10):1149-58).

Por la omisión dirigida de un exón específico, un fenotipo de DMD se convierte en un fenotipo de DMB más leve. La omisión de un exón se induce preferentemente por la unión de AON que se dirigen a secuencias internas del exón. Un oligonucleótido dirigido hacia una secuencia interna del exón normalmente no presenta solapamiento con secuencias no de exón. Preferentemente no se solapa con los sitios de corte y empalme al menos no en tanto que éstos estén presentes en el intrón. Un oligonucleótido dirigido hacia una secuencia interna del exón preferentemente no contiene una secuencia complementaria a un intrón adyacente. Adicionalmente se proporciona así un oligonucleótido según la invención, en el que dicho oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, es para inhibir la inclusión de un exón de un pre-ARNm de distrofina en ARNm producido a partir del corte y empalme de dicho pre-ARNm. Una técnica de omisión de exones se aplica preferentemente de forma que la ausencia de un exón del ARNm producido a partir del pre-ARNm de distrofina genere una región codificante para una proteína distrofina más funcional – sin embargo más corta. En este contexto, la inhibición de la inclusión de un exón significa preferentemente que la detección del ARNm de distrofina aberrante original y/o proteína disminuye como se ha definido previamente en el presente documento.

Dentro del contexto de la invención, un equivalente funcional de un oligonucleótido significa preferentemente un oligonucleótido como se define en el presente documento en el que uno o más nucleótidos se han sustituido y en el

que una actividad de dicho equivalente funcional se retiene a al menos algún grado. Preferentemente, una actividad de dicho equivalente funcional es proporcionar una proteína distrofina funcional. Dicha actividad de dicho equivalente funcional se evalúa, por tanto, preferentemente cuantificando la cantidad de una proteína distrofina funcional o cuantificando la cantidad de un ARNm de distrofina funcional. Una proteína distrofina funcional (o un ARNm de distrofina funcional) se define en el presente documento preferentemente como que es una proteína distrofina (o una proteína distrofina codificada por dicho ARNm) capaz de unirse a actina y a miembros de la proteína DGC. La evaluación de dicha actividad de un oligonucleótido se hace preferentemente por RT-PCR (m-ARN) o por análisis de inmunofluorescencia o de transferencia Western (proteína). Dicha actividad se retiene preferentemente a al menos algún grado cuando representa al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o más de la actividad correspondiente de dicho oligonucleótido del que se deriva el equivalente funcional. Tal actividad puede medirse en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo o *in vitro* en una célula por comparación con una actividad de un oligonucleótido correspondiente de dicho oligonucleótido del que se deriva el equivalente funcional. En toda la presente solicitud, cuando la palabra oligonucleótido se usa, puede sustituirse por un equivalente funcional de la misma, como se define en el presente documento.

En una realización preferida, un oligonucleótido de la divulgación, que comprende una secuencia que se une y/o es complementaria a una secuencia del exón 44 de pre-ARNm de distrofina como se ha definido anteriormente en el presente documento, es tal que la parte complementaria sea al menos el 50% de la longitud del oligonucleótido de la divulgación, más preferentemente al menos el 60%, incluso más preferentemente al menos el 70%, incluso más preferentemente al menos el 80%, incluso más preferentemente al menos el 90% o incluso más preferentemente al menos el 95%, o incluso más preferentemente el 98% o incluso más preferentemente al menos el 99%, o incluso más preferentemente el 100%. En una realización más preferida, un oligonucleótido de la divulgación consiste en una secuencia que es complementaria a parte de pre-ARNm de distrofina como se define en el presente documento. Como un ejemplo, un oligonucleótido puede comprender una secuencia que es complementaria a parte de pre-ARNm de distrofina como se define en el presente documento y secuencias flanqueantes adicionales. En una realización más preferida de la divulgación, la longitud de dicha parte complementaria de dicho oligonucleótido es de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 nucleótidos. Preferentemente, se usan secuencias flanqueantes adicionales para modificar la unión de una proteína al oligonucleótido, o para modificar una propiedad termodinámica del oligonucleótido, más preferentemente para modificar la afinidad de unión a ARN diana.

Así, no se requiere absolutamente que todas las bases en la región de complementariedad sean capaces de aparearse con bases en la hebra opuesta. Por ejemplo, cuando se diseña el oligonucleótido puede quererse incorporar, por ejemplo, un residuo que no aparea bases con la base sobre la hebra complementaria. Los desapareamientos pueden, de algún modo, permitirse, si bajo las circunstancias en la célula, la extensión de nucleótidos es suficientemente capaz de hibridarse con la parte complementaria. En este contexto, "suficientemente" significa preferentemente que, usando un ensayo de desplazamiento por movilidad del gel como se describe en el Ejemplo 1 del documento EP 1 619 249, es detectable la unión de un oligonucleótido. Opcionalmente, dicho oligonucleótido puede probarse adicionalmente por la transfección en células de músculo de pacientes. La omisión del exón dirigido puede evaluarse por RT-PCR (como se describe en el documento EP 1 619 249). Las regiones complementarias se diseñan preferentemente de forma que, cuando se combinen, sean específicas para el exón en el pre-ARNm. Tal especificidad puede crearse con diversas longitudes de regiones complementarias, ya que esto depende de las actuales secuencias en otro (pre-)ARNm en el sistema. El riesgo de que también uno o varios de otros pre-ARNm sean capaces de hibridarse con el oligonucleótido disminuye al aumentar el tamaño del oligonucleótido. Es evidente que los oligonucleótidos que comprenden desapareamientos en la región de complementariedad, pero que retienen la capacidad de hibridarse y/o unirse a la(s) región(es) elegida(s) como diana en el pre-ARNm, pueden usarse en la presente divulgación. Sin embargo, preferentemente al menos las partes complementarias no comprenden tales desapareamientos, ya que éstos tienen normalmente una mayor eficiencia y una mayor especificidad que los oligonucleótidos que tienen tales desapareamientos en una o más regiones complementarias. Se cree que mayores resistencias de hibridación (es decir, aumentar el número de interacciones con la hebra opuesta) son favorables en aumentar la eficiencia del procedimiento de interferir con la maquinaria de corte y empalme del sistema. Preferentemente, la complementariedad está entre el 90 y el 100%. En general, esto se permite durante 1 ó 2 desapareamiento(s) en un oligonucleótido de 20 nucleótidos o 1, 2, 3 o 4 desapareamientos en un oligonucleótido de 40 nucleótidos, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 desapareamientos en un oligonucleótido de 60 nucleótidos.

Una molécula preferida de la divulgación comprende o consiste en una secuencia basada en nucleótidos que es antisentido a una secuencia seleccionada del exón 44 del pre-ARNm de DMD. La secuencia del pre-ARNm de DMD está seleccionada preferentemente de SEC ID N° 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU; SEC ID N° 2: 5'-GGGAACAUGC AAAUAC, SEC ID N° 3: 5'-AGACACAAAUCCUGAGA y SEC ID N° 4: 5'-CUGUUGAGAAA.

Una molécula de la invención es preferentemente una molécula aislada.

Una molécula de la divulgación es preferentemente una molécula de ácido nucleico o una molécula basada en nucleótidos o un oligonucleótido o un oligonucleótido antisentido que se une y/o es complementario a una secuencia

del exón 44 seleccionada de SEC ID N°: 1, 2, 3 o 4.

Una molécula preferida de la invención comprende o consiste en de aproximadamente 8 a aproximadamente 60 nucleótidos, más preferida de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, más preferida de aproximadamente 17 a aproximadamente 40 nucleótidos, más preferida de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 nucleótidos, más preferida de aproximadamente 18 a aproximadamente 24 nucleótidos, lo más preferido aproximadamente 20 nucleótidos, tales como 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos o 23 nucleótidos.

Una molécula preferida de la invención comprende o consiste en de 8 a 60 nucleótidos, más preferida de 10 a 50 nucleótidos, más preferida de 17 a 40 nucleótidos, más preferida de 18 a 30 nucleótidos, más preferida de 21 a 60, más preferida de 22 a 55, más preferida de 23 a 53, más preferida de 24 a 50, más preferida de 25 a 45, más preferida de 26 a 43, más preferida de 27 a 41, más preferida de 28 a 40, más preferida de 29 a 40, más preferida de 18 a 24 nucleótidos, o preferentemente comprende o consiste en 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 nucleótidos.

En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una molécula que comprende o que consiste en una secuencia de nucleótidos antisentido seleccionada de las secuencias de nucleótidos antisentido representadas en la Tabla 1A.

Una molécula o molécula de ácido nucleico de la divulgación que se une y/o es complementaria y/o es antisentido a un nucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos: SEC ID N° 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU preferentemente comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEC ID N° 5; SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24, SEC ID N° 25, SEC ID N° 26, SEC ID N° 27, SEC ID N° 28, SEC ID N° 29, SEC ID N° 30, SEC ID N° 31, SEC ID N° 32, SEC ID N° 33, SEC ID N° 34, SEC ID N° 35, SEC ID N° 36, SEC ID N° 37, SEC ID N° 38, SEC ID N° 39, SEC ID N° 41, SEC ID N° 42, SEC ID N° 49 o SEC ID N° 54. Una molécula preferida que dirige esta región del pre-ARNm de DMD comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEC ID N°: 5, SEC ID N° 49 o SEC ID N° 54. El oligonucleótido más preferido comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEC ID N°: 5.

En una realización más preferida, la invención proporciona una molécula que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido SEC ID N° 5: 5'-UCAGCUUCUGUUAGCCACUG. Se encontró que esta molécula era muy eficaz en modular el corte y empalme del exón 44 del gen de DMD en células de músculo. Esta molécula preferida de la invención que comprende SEC ID N°: 5 comprende de 21 a 60, más preferido de 22 a 55, más preferido de 23 a 53, más preferido de 24 a 50, más preferido de 25 a 45, más preferido de 26 a 43, más preferido de 27 a 41, más preferido de 28 a 40, más preferido de 29 a 40, o preferentemente comprende o consiste en 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 nucleótidos.

En otra realización preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido SEC ID N° 49 o 54. Estas moléculas preferidas de la divulgación que comprenden tanto SEC ID N°: 49 como SEC ID N°: 54 comprenden además de 18 a 60, más preferido de 18 a 55, más preferido de 20 a 53, más preferido de 24 a 50, más preferido de 25 a 45, más preferido de 26 a 43, más preferido de 27 a 41, más preferido de 28 a 40, más preferido de 29 a 40, o preferentemente comprende o consiste en 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 nucleótidos.

En otra realización, una molécula de la divulgación que es antisentido a SEC ID N° 2: 5'-GGGAACAUGC UAAAUAAC preferentemente comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEC ID N° 43 o SEC ID N° 44. Estas moléculas preferidas de la divulgación que comprenden tanto SEC ID N°: 43 como SEC ID N°: 44 comprenden además de 17 a 60 nucleótidos, más preferido de 18 a 30 nucleótidos, más preferido de 21 a 60, más preferido de 22 a 55, más preferido de 23 a 53, más preferido de 24 a 50, más preferido de 25 a 45, más preferido de 26 a 43, más preferido de 27 a 41, más preferido de 28 a 40, más preferido de 29 a 40, más preferido de 18 a 24 nucleótidos, o preferentemente comprenden o consisten en 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 nucleótidos.

En todavía otra realización, una molécula de la divulgación que es antisentido a SEC ID N° 3: 5'-AGACACAAAUCCUGAGA preferentemente comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEC ID N° 47 o SEC ID N° 48. Estas moléculas preferidas de la divulgación que comprenden tanto SEC ID N°: 47 como SEC ID N°: 48 comprenden además de 17 a 60 nucleótidos, más preferido de 18 a 30 nucleótidos, más preferido de 17 a 60, más preferido de 22 a 55, más preferido de 23 a 53, más preferido de 24 a 50, más preferido de 25 a 45, más preferido de 26 a 43, más preferido de 27 a 41, más preferido de 28 a 40, más preferido de 29 a 40, más preferido de 18 a 24 nucleótidos, o preferentemente comprenden o consisten en 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 nucleótidos.

En todavía otra realización, una molécula de la divulgación que es antisentido a SEC ID N° 4: 5'-CUGUUGAGAAA preferentemente comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEC ID N° 45 o SEC ID N° 46. Estas moléculas preferidas de la divulgación que comprenden tanto SEC ID N°: 45 como SEC ID N°: 46 comprenden además de 11 a 60 nucleótidos, más preferido de 11 a 30 nucleótidos, más preferido de 11 a 60, o preferentemente comprenden o consisten en 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 nucleótidos.

Una secuencia de nucleótidos de una molécula de la invención puede contener residuos de ARN, o uno o más residuos de ADN, y/o uno o más análogos de nucleótidos o equivalentes, como se detallará adicionalmente en el presente documento más adelante.

Se prefiere que una molécula de la invención comprenda uno o más residuos que se modifican para aumentar la resistencia a nucleasas, y/o para aumentar la afinidad del nucleótido antisentido por la secuencia diana. Por tanto, en una realización preferida, la secuencia de nucleótidos antisentido comprende al menos un análogo de nucleótido o equivalente, en la que un análogo de nucleótido o equivalente se define como un residuo que tiene una base modificada, y/o un esqueleto modificado, y/o un enlace internucleosídico no natural, o una combinación de estas modificaciones.

En una realización preferida, el análogo de nucleótido o equivalente comprende un esqueleto modificado. Ejemplos de tales esqueletos se proporcionan por esqueletos de morfolino, esqueletos de carbamato, esqueletos de siloxano, esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona, esqueletos de formaceto y tioformaceto, esqueletos de metilformaceto, esqueletos de riboaceto, esqueletos que contienen alqueno, esqueletos de sulfamato, sulfonato y sulfonamida, esqueletos de metilnimino y metilhidrazino, y esqueletos de amida. Los oligómeros de fosfordiamidato morfolino son oligonucleótidos de esqueleto modificados que se han investigado previamente como agentes antisentido. Los oligonucleótidos de morfolino tienen un esqueleto sin carga en el que el azúcar de desoxirribosa del ADN está sustituido con un anillo de seis miembros y el enlace de fosfodiéster está sustituido con un enlace fosfordiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino son resistentes a la degradación enzimática y parecen funcionar como agentes antisentido deteniendo la traducción o interfiriendo con el corte y empalme de pre-ARNm en vez de activando RNasa H. Los oligonucleótidos de morfolino se han administrado satisfactoriamente para el cultivo de células de tejido por procedimientos que rompen físicamente la membrana celular, y un estudio que compara varios de estos procedimientos encontró que la carga de raspaduras era el procedimiento de administración más eficaz; sin embargo, debido a que el esqueleto de morfolino está sin cargar, los lípidos catiónicos no son mediadores eficaces de la captación de oligonucleótidos de morfolino en células. Un informe reciente demostró la formación de tríplex por un oligonucleótido de morfolino y, debido al esqueleto no iónico, estos estudios mostraron que el oligonucleótido de morfolino era capaz de la formación de tríplex en ausencia de magnesio.

Se prefiere adicionalmente que el enlace entre los residuos en un esqueleto no incluya un átomo de fósforo, tal como un enlace que se forma por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mezclados, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta.

Un análogo de nucleótido preferido o equivalente comprende un ácido nucleico peptídico (PNA), que tiene un esqueleto de poliamida modificado (Nielsen, y col., (1991) Science 254, 1497-1500). Las moléculas basadas en PNA son miméticos verdaderos del ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. El esqueleto del PNA está compuesto por unidades de N-(2-aminoetil)-glicina enlazadas por enlaces peptídicos, en las que las nucleobases están enlazadas al esqueleto por enlaces de metilencarbonilo. Un esqueleto alternativo comprende un monómero de pirrolidina-PNA extendido un carbono (Govindaraju y Kumar (2005) Chem. Commun, 495-497). Como el esqueleto de una molécula de PNA no contiene grupos fosfato cargados, los híbridos de PNA-ARN son normalmente más estables que los híbridos de ARN-ARN o ARN-ADN, respectivamente (Egholm y col. (1993) Nature 365, 566-568).

Otro esqueleto preferido comprende un análogo de nucleótidos de morfolino o equivalente, en el que el azúcar de ribosa o desoxirribosa está sustituido con un anillo de morfolino de 6 miembros. Un análogo de nucleótidos más preferido o equivalente comprende un oligómero de fosfordiamidato morfolino (PMO), en el que el azúcar de ribosa o desoxirribosa está sustituido con un anillo de morfolino de 6 miembros, y el enlace fosfodiéster aniónico entre anillos de morfolino adyacentes está sustituido con un enlace fosfordiamidato no iónico.

En todavía otra realización, un análogo de nucleótido o equivalente de la invención comprende una sustitución de uno de los oxígenos que no forma puente en el enlace fosfodiéster. Esta modificación ligeramente desestabiliza el apareamiento de bases, pero añade resistencia significativa a la degradación por nucleasas. Un análogo de nucleótido preferido o equivalente comprende fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, H-fosfonato, fosfonato de metilo y otro alquilo que incluye fosfonato de 3'-alquileo, fosfonato de 5'-alquileo y fosfonato quiral, fosfinato, fosforamidato que incluye fosforamidato de 3'-amino y aminoalquilfosforamidato, tionofosforamidato, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriéster, selenofosfato o boranofosfato.

Otro análogo de nucleótido preferido o equivalente de la invención comprende uno o más restos de azúcar que están mono- o disustituidos en la posición 2', 3' y/o 5' tal como -OH; -F; alquilo (C1-C10), alqueno, alquino, alcarilo,

alilo, o aralquilo inferior sustituido o sin sustituir, lineal o ramificado, que puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueniilo; O-, S-, o N-alquiniilo; O-, S-, o N-alilo; O-alquil-O-alquilo, -metoxi, -aminopropoxi; metoxietoxi; -dimetilaminooxietoxi; y -dimetilaminoetoxietoxi. El resto de azúcar puede ser una piranosa o derivado de la misma, o una desoxipiranosa o derivado de la misma, preferentemente ribosa o derivado de la misma, o desoxirribosa o derivado de la misma. Un resto de azúcar derivatizado preferido comprende un ácido nucleico bloqueado (LNA), en el que el átomo de carbono en 2' está enlazado con el átomo de carbono en 3' o 4' del anillo de azúcar, formando así un resto de azúcar bicíclico. Un LNA preferido comprende ácido nucleico unido por puente de 2'-O,4'-C-etileno (Morita y col., 2001. Nucleic Acid Res Supplement No. 1: 241-242). Estas sustituciones convierten el análogo de nucleótido o equivalente en resistente a RNasa H y nucleasa y aumentan la afinidad por el ARN diana.

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

Se entiende por un experto que no es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido antisentido se modifiquen uniformemente. Además, más de uno de los análogos o equivalentes anteriormente mencionados puede incorporarse en un único oligonucleótido antisentido o incluso en una única posición dentro de un oligonucleótido antisentido. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido de la invención tiene al menos dos tipos diferentes de análogos o equivalentes.

Un oligonucleótido antisentido preferido según la invención comprende un oligonucleótido antisentido de 2'-O-alquilfosforotioato, tal como ribosa modificada con 2'-O-metilo (ARN), ribosa modificada con 2'-O-etilo, ribosa modificada con 2'-O-propilo, y/o derivados sustituidos de estas modificaciones tales como derivados halogenados.

Un oligonucleótido antisentido más preferido según la invención comprende una 2'-O-metil-fosforotioato-ribosa.

También se entenderá por un experto que pueden combinarse diferentes oligonucleótidos antisentido para omitir eficazmente el exón 44. En una realización preferida de la divulgación se usa una combinación de al menos dos oligonucleótidos antisentido en un procedimiento de la invención, tal como dos oligonucleótidos antisentido diferentes, tres oligonucleótidos antisentido diferentes, cuatro oligonucleótidos antisentido diferentes, o cinco oligonucleótidos antisentido diferentes.

Un oligonucleótido antisentido puede ligarse a un resto que potencie la captación del oligonucleótido antisentido en células, preferentemente células miogénicas o células de músculo. Ejemplos de tales restos son colesterolos, hidratos de carbono, vitaminas, biotina, lípidos, fosfolípidos, péptidos que penetran en las células que incluyen, pero no se limitan a, antenapedios, TAT, aminoácidos de transporte y positivamente cargados tales como oligoarginina, poli-arginina, oligolisina o polilisina, dominios de unión al antígeno tales como los proporcionados por un anticuerpo, un fragmento Fab de un anticuerpo, o un dominio de unión al antígeno monocatenario tal como un dominio de unión al antígeno del dominio único de cameloide.

Un oligonucleótido antisentido preferido comprende un PMO asociado a péptido.

Un oligonucleótido de la invención puede administrarse indirectamente usando medios adecuados conocidos en la técnica. Un oligonucleótido puede, por ejemplo, proporcionarse a un individuo o una célula, tejido u órgano de dicho individuo en forma de un vector de expresión en el que el vector de expresión codifica un transcrito que comprende dicho oligonucleótido. El vector de expresión se introduce preferentemente en una célula, tejido, órgano o individuo mediante un vehículo de administración génica. En una realización preferida, se proporciona un vector de expresión basado en virus que comprende un casete de expresión o un casete de transcripción que conduce la expresión o transcripción de una molécula como se identifica en el presente documento. Una célula puede proveerse de una molécula que puede interferir con secuencias esenciales que producen la omisión altamente eficiente del exón 44 por expresión de oligonucleótido antisentido derivado de plásmido o expresión viral proporcionada por vectores basados en adenovirus o virus adenoasociados. La expresión se conduce preferentemente por un promotor de la polimerasa III, tal como un promotor de ARN U1, U6 o U7. Un vehículo de administración preferido es un vector viral tal como un vector de virus adenoasociado (AAV), o un vector retroviral tal como un vector lentivirus (Goyenvallé A, y col. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. Science 2004;306(5702):1796-9, De Angelis FG, y col. 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 U S A 2002;99(14):9456-61 o Denti MA, y col. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. Hum Gene Ther 2006;17(5):565-74) y similares. Por tanto, plásmidos, cromosomas artificiales, plásmidos útiles para la recombinación homóloga dirigida e integración en el genoma humano de células pueden aplicarse adecuadamente para la administración de un oligonucleótido como se define en el presente documento. Son preferidos para la presente invención aquellos vectores en los que la transcripción se conduce de promotores Pol III, y/o en los que los transcritos están en la forma de fusiones con transcritos de U1 o U7, que dan buenos resultados globales para administrar transcritos pequeños. Está dentro de la experiencia del experto diseñar transcritos adecuados. Se

prefieren transcritos dirigidos por Pol III. Preferentemente, en forma de un transcrito de fusión con un transcrito U1 o U7 (véase lo mismo en Goyenvallé A y col., De Angelis FG y col. o Denti MA y col.). Tales fusiones pueden generarse como se ha descrito (Gorman L, y col., Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(9):4929-34 o Suter D, y col., Double-target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta-thalassemic mutations. Hum Mol Genet 1999;8(13):2415-23).

El oligonucleótido puede administrarse como tal. Sin embargo, el oligonucleótido también puede codificarse por el vector viral. Normalmente, éste está en forma de un transcrito de ARN que comprende la secuencia del oligonucleótido en una parte del transcrito.

Un sistema de expresión de oligonucleótido antisentido preferido es un vector basado en virus asociado a adenovirus (AAV). Se han desarrollado vectores basados en AAV monocatenarios y bicatenarios que pueden usarse para la expresión prolongada de secuencias de nucleótidos antisentido pequeños para la omisión altamente eficiente del exón 44 de DMD.

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

Por tanto, la invención también proporciona un vector basado en virus que comprende un casete de expresión dirigido por el promotor Pol III para la expresión de un oligonucleótido antisentido de la invención para inducir la omisión del exón 44 del gen de DMD.

Se esperan mejoras en los medios para proveer un individuo o una célula, tejido, órgano de dicho individuo de un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo considerando el progreso que ya se ha logrado hasta ahora. Tales mejoras futuras pueden, por supuesto, incorporarse para lograr el efecto mencionado sobre la re-estructuración de ARNm usando un procedimiento de la invención. Un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo puede administrarse como tal a un individuo, una célula, tejido u órgano de dicho individuo. Cuando se administra un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo, se prefiere que un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo se disuelva en una disolución que es compatible con el procedimiento de administración. Las células de músculo o miogénicas pueden proveerse de un plásmido para la expresión de oligonucleótidos antisentido proporcionando el plásmido en una disolución acuosa. Alternativamente, puede proporcionarse un plásmido por transfección usando agentes de transfección conocidos. Para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal y/o intraventricular se prefiere que la disolución sea una disolución salina fisiológica. Es particularmente preferido en la invención el uso de un excipiente o agentes de transfección que ayudarán en la administración de cada uno de los constituyentes como se define en el presente documento a una célula y/o en una célula, preferentemente una célula de músculo. Se prefieren excipientes o agentes de transfección que puedan formar complejos, nanopartículas, micelas, vesículas y/o liposomas que administran cada constituyente como se define en el presente documento, complejados o atrapados en una vesícula o liposoma mediante una membrana celular. Muchos de estos excipientes se conocen en la técnica. Excipientes o agentes de transfección adecuados comprenden polietilenimina (PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) o derivados de los mismos, o polímeros catiónicos similares, que incluyen copolímero de polipropilenoimina o polietilenimina (PEC) y derivados, anfífilos sintéticos (SAINT-18), Lipofectin™, DOTAP y/o proteínas de la cápside viral que son capaces de auto-ensamblarse en partículas que pueden administrar cada constituyente como se define en el presente documento a una célula, preferentemente una célula de músculo. Se ha mostrado que tales excipientes administran eficazmente un oligonucleótido tal como ácidos nucleicos antisentido a una amplia variedad de células cultivadas, que incluyen células de músculo. Su alto potencial de transfección se combina con una toxicidad exceptuada de baja a moderada en términos de supervivencia celular global. La facilidad de modificación estructural puede usarse para permitir modificaciones adicionales y el análisis de sus características de transferencia de ácidos nucleicos (*in vivo*) adicionales y toxicidad.

Lipofectin representa un ejemplo de un agente de transfección liposómica. Consiste en dos componentes de lípido, un lípido catiónico cloruro de N-(1-(2,3 dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) (véase DOTAP que es la sal de metilsulfato) y un lípido neutro dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). El componente neutro media en la liberación intracelular. Otro grupo de sistemas de administración son nanopartículas poliméricas.

Policationes tales como dietilaminoetilaminoetilo (DEAE)-dextrano, que son muy conocidos como reactivo de transfección de ADN, pueden combinarse con cianoacrilato de butilo (PBCA) y cianoacrilato de hexilo (PHCA) para formular nanopartículas catiónicas que pueden administrar cada constituyente como se define en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido a través de membranas celulares en células.

Además de estos materiales de nanopartícula comunes, el péptido catiónico protamina ofrece un enfoque alternativo para formular un oligonucleótido con coloides. Este sistema de nanopartículas coloidales puede formar las llamadas protículas, que pueden prepararse por un simple procedimiento de auto-ensamblaje para envasar y mediar en la liberación intracelular de un oligonucleótido. El experto puede seleccionar y adaptar cualquiera de los excipientes y sistemas de administración alternativos anteriores u otros comercialmente disponibles para envasar y administrar un oligonucleótido para su uso en la presente invención para administrarlo para el tratamiento de distrofia muscular de

Duchenne o distrofia muscular de Becker en seres humanos.

Además, un oligonucleótido podría enlazarse covalentemente o no covalentemente a un ligando que elige diana, específicamente diseñado para facilitar la captación dentro de la célula, citoplasma y/o su núcleo. Tal ligando podría comprender (i) un compuesto (que incluye, pero no se limita a, estructuras (tipo) péptido) que reconocen elementos específicos de la célula, tejido u órgano que facilitan la captación celular y/o (ii) un compuesto químico puede facilitar la captación dentro de células y/o la liberación intracelular de un oligonucleótido de vesículas, por ejemplo, endosomas o lisosomas.

Por tanto, en una realización preferida, un oligonucleótido se formula en una composición o un medicamento o una composición, que está provisto de al menos un excipiente y/o un ligando que elige diana para la administración y/o un dispositivo de administración del mismo a una célula y/o potenciar su administración intracelular. Por consiguiente, la invención también engloba una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un oligonucleótido y que comprende además al menos un excipiente y/o un ligando que elige diana para la administración y/o un dispositivo de administración de dicho oligonucleótido a una célula y/o potenciar su administración intracelular.

Debe entenderse que si una composición comprende un constituyente adicional tal como un compuesto adyuvante como se define después en el presente documento, cada constituyente de la composición puede no formularse en una única combinación o composición o preparación. Dependiendo de su identidad, el experto sabrá qué tipo de formulación es la más apropiada para cada constituyente, como se define en el presente documento. En una realización preferida, la invención proporciona una composición o una preparación que está en forma de un kit de partes que comprende un oligonucleótido y otro compuesto adyuvante como se define después en el presente documento.

Un oligonucleótido preferido es para prevenir o tratar distrofia muscular de Duchenne (DMD) o distrofia muscular de Becker (DMB) en un individuo. Un individuo, que puede tratarse usando un oligonucleótido de la invención, puede ya haber sido diagnosticado como que tiene una DMD o a DMB. Alternativamente, un individuo que puede tratarse usando un oligonucleótido de la invención puede no haber sido diagnosticado todavía como que tiene una DMD o una DMB, pero puede ser un individuo que tiene un elevado riesgo de desarrollar una DMD o una DMB en el futuro dados sus antecedentes genéticos. Un individuo preferido es un ser humano.

Si se requiere, una molécula o un vector que expresa un oligonucleótido antisentido de la invención puede incorporarse en una mezcla farmacéuticamente activa añadiendo un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por tanto, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula que comprende un oligonucleótido antisentido según la invención, o un vector basado en virus que expresa el oligonucleótido antisentido según la invención.

En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende un oligonucleótido como se define en el presente documento. Preferentemente, dicha composición comprende al menos dos oligonucleótidos distintos como se define en el presente documento. Más preferentemente, estos dos oligonucleótidos distintos se diseñan para omitir uno o dos o más exones. La multi-omisión está englobada por la presente invención, en la que un oligonucleótido de la invención que induce la omisión del exón 44 se usa en combinación con otro oligonucleótido que induce la omisión de otro exón. En este contexto, otro exón puede ser el exón 43, 45 o 52. La multi-omisión de exones ya se ha desvelado en el documento EP 1 619 249. El gen de DMD es un gen grande, con muchos exones diferentes. Considerando que el gen se localiza sobre el cromosoma X, son principalmente los chicos los que son afectados, aunque las chicas también puede afectarse por la enfermedad, ya que pueden recibir una copia mala del gen de ambos padres, o están padeciendo una inactivación particularmente sesgada del alelo funcional debido a una inactivación del cromosoma X particularmente sesgada en sus células de músculo. La proteína está codificada por una pluralidad de exones (79) durante un intervalo de al menos 2,4 Mb. Pueden producirse defectos en cualquier parte del gen de DMD. La omisión de un exón particular o exones particulares puede, muy frecuentemente, producir un ARNm re-estructurado que codifica una proteína distrofina más corta de la normal, pero al menos parcialmente funcional. Un problema práctico en el desarrollo de un medicamento basado en la tecnología de omisión de exones es la pluralidad de mutaciones que puede producir una deficiencia en la proteína distrofina funcional en la célula. A pesar del hecho de que ya pueden corregirse múltiples mutaciones diferentes omitiendo un único exón, esta pluralidad de mutaciones requiere la generación de una serie de diferentes productos farmacéuticos ya que para diferentes mutaciones necesitan omitirse diferentes exones. Una ventaja de un oligonucleótido o de una composición que comprende al menos dos oligonucleótidos distintos como se define después en el presente documento capaz de inducir la omisión de dos o más exones, es que más de un exón puede omitirse con un único producto farmacéutico. Esta propiedad no solo es prácticamente muy útil porque solo se necesita generar un número limitado de productos farmacéuticos para tratar muchas mutaciones de DMD diferentes o, en particular, de DMB grave. Otra opción que se abre ahora para el experto en la materia es seleccionar proteínas distrofinas re-estructuradas particularmente funcionales y producir compuestos capaces de generar estas proteínas distrofinas preferidas. Tales resultados finales preferidos se denominan adicionalmente distrofinas de fenotipo leve.

En una realización preferida, dicha composición es preferentemente una composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición farmacéutica un vehículo farmacéuticamente aceptable, adyuvante, diluyente y/o excipiente. También se proporciona una composición farmacéutica tal que puede comprender cualquier vehículo, carga, conservante, adyuvante, solubilizante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo, carga, conservante, adyuvante, solubilizante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable puede encontrarse, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, DM: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cada característica de dicha composición se ha definido previamente en el presente documento.

Si se usan varios oligonucleótidos, la concentración o dosis como ya se ha definido en el presente documento puede referirse a la concentración total o dosis de todos los oligonucleótidos usados o a la concentración o dosis de cada oligonucleótido usado o añadido. Por tanto, en una realización, se proporciona una composición en la que cada uno o la cantidad total de oligonucleótido usado se dosifica en una cantidad que oscila entre 0,5 mg/kg y 10 mg/kg.

La invención proporciona además el uso de un oligonucleótido antisentido según la invención, o un vector basado en virus que expresa un oligonucleótido antisentido según la invención, para modular el corte y empalme del ARNm de DMD. El corte y empalme se modula preferentemente en células miogénicas o células de músculo humanas *in vitro*. Es más preferido que el corte y empalme se module en células miogénicas o células de músculo humanas *in vivo*.

Un oligonucleótido antisentido preferido que comprende uno o más análogos de nucleótidos o equivalentes de la invención modula el corte y empalme en una o más células de músculo, que incluyen células de músculo cardíaco, tras la administración sistémica. A este respecto, la administración sistémica de un oligonucleótido antisentido que comprende un análogo de nucleótidos específico o equivalente podría producir la elección como diana de un subconjunto de células de músculo, mientras que un oligonucleótido antisentido que comprende un análogo de nucleótidos distinto o equivalente podría producir la elección como diana de un subconjunto de células de músculo diferente. Por tanto, en una realización se prefiere usar una combinación de oligonucleótidos antisentido que comprende diferentes análogos de nucleótidos o equivalentes para modular la omisión del exón 44 del ARNm de DMD.

La invención proporciona además el uso de un oligonucleótido antisentido según la invención, o de un vector basado en virus que expresa el oligonucleótido antisentido según la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con DMD o DMB.

Por tanto, en otro aspecto, se proporciona el uso de un oligonucleótido o de una composición como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en un individuo. Cada característica de dicho uso se ha definido anteriormente en el presente documento.

Un tratamiento en un uso o en un procedimiento según la invención es al menos una semana, al menos un mes, al menos varios meses, al menos un año, al menos 2, 3, 4, 5, 6 años o más. Cada molécula u oligonucleótido o equivalente del mismo, como se define en el presente documento para su uso según la invención, puede ser adecuada para la administración directa a una célula, tejido y/o un órgano *in vivo* de individuos afectados por o en riesgo de desarrollar DMD o DMB, y puede administrarse directamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La frecuencia de administración de un oligonucleótido, composición, compuesto o compuesto adyuvante de la invención puede depender de varios parámetros tales como la edad del paciente, la mutación del paciente, el número de moléculas (es decir, dosis), la formulación de dicha molécula. La frecuencia puede oscilar entre al menos una vez en dos semanas, o tres semanas o cuatro semanas o cinco semanas o un periodo de tiempo más largo.

Los intervalos de dosis de oligonucleótido según la invención se diseñan preferentemente basándose en estudios de dosis crecientes en ensayos clínicos (uso *in vivo*) para los que existen requisitos de protocolo rigurosos. Una molécula o un oligonucleótido como se define en el presente documento puede usarse a una dosis que oscila entre 0,1 y 20 mg/kg, preferentemente 0,5 y 10 mg/kg.

En una realización preferida se usa una concentración de un oligonucleótido como se define en el presente documento, que oscila entre 0,1 nM y 1 µM. Preferentemente, este intervalo es para uso *in vitro* en un modelo celular tal como células musculares o tejido muscular. Más preferentemente, la concentración usada oscila entre 0,3 y 400 nM, incluso más preferentemente entre 1 y 200 nM. Si se usan varios oligonucleótidos, esta concentración o dosis puede referirse a la concentración total o dosis de oligonucleótidos o la concentración o dosis de cada oligonucleótido añadido. Los intervalos de concentración o dosis de oligonucleótido(s) como se dan anteriormente son concentraciones o dosis preferidas para usos *in vitro* o *ex vivo*. El experto entenderá que, dependiendo del (de los) oligonucleótido(s) usado(s), la célula diana que va a tratarse, el gen diana y sus niveles de expresión, el medio usado y las condiciones de transfección e incubación, la concentración o dosis de oligonucleótido(s) usada puede variar adicionalmente y puede necesitar optimizarse adicionalmente.

Un oligonucleótido, como se define en el presente documento para su uso según la invención, puede ser adecuado para administración a una célula, tejido y/o un órgano *in vivo* de individuos afectados por o en riesgo de desarrollar DMD o DMB, y puede administrarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Dicho oligonucleótido puede administrarse directamente o indirectamente a una célula, tejido y/o un órgano *in vivo* de un individuo afectado por o en riesgo de

desarrollar DMD o DMB, y puede administrarse directamente o indirectamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Como la distrofia muscular de Duchenne y de Becker tienen un fenotipo pronunciado en células de músculo, se prefiere que dichas células sean células de músculo, se prefiere adicionalmente que dicho tejido sea un tejido muscular y/o se prefiere adicionalmente que dicho órgano comprenda o consista en un tejido muscular. Un órgano preferido es el corazón. Preferentemente, dichas células comprenden un gen que codifica una proteína distrofina mutante. Preferentemente, dichas células son células de un individuo que padece DMD o DMB.

A menos que se indique lo contrario, cada realización como se describe en el presente documento puede combinarse con otra realización como se describe en el presente documento.

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo “comprender” y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitante para significar que los artículos tras la palabra están incluidos, pero artículos no específicamente mencionados no se excluyen. Además, “consistir” puede sustituirse por “consistir esencialmente en”, que significa que un compuesto o compuesto adyuvante como se define en el presente documento puede comprender componente(s) adicional(es) distinto(s) a los específicamente identificados, no alterando dicho(s) componente(s) adicional(es) la característica única de la invención.

Además, referencia a un elemento por el artículo indefinido “un” o “una” no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que sea uno y solo uno de los elementos. Así, el artículo indefinido “un” o “una” significa normalmente “al menos uno”.

La palabra “aproximadamente”, cuando se usa en asociación con un valor numérico (aproximadamente 10), preferentemente significa que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos el 1% del valor.

La expresión “*in vivo*”, como se usa en el presente documento, puede significar un sistema celular que puede aislarse del organismo del que se derivan las células. Células preferidas son células de músculo. *In vivo* puede también significar en un tejido o en un organismo multicelular que es preferentemente un paciente como se define en el presente documento. En toda la invención, *in vivo* es opuesto a *in vitro*, que está generalmente asociado a un sistema libre de células.

Cada realización como se identifica en el presente documento pueden combinarse juntas, a menos que se indique lo contrario.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para aclarar la invención.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Evaluación de AON diseñados para inducir la omisión del exón 44 del gen de DMD en células de músculo transfectadas de control sano o un paciente con DMD con una delección del exón 45.

(A) En células de músculo diferenciadas (miotubos) de un paciente con una delección del exón 45, todos los AON probados (transfectados) indujeron la omisión del exón 44 a una concentración de 150 nM, demostrando PS188 (SEC ID N°: 5), PS190 (previamente publicado como h44AON2; Aartsma-Rus y col., Neuromuscul Disord 2002; 12 Suppl: S71), PS191 (SEC ID N°: 47), PS193 (SEC ID N°: 48), PS194 (SEC ID N°: 46) y PS196 (SEC ID N°: 51) las mayores eficiencias (entre el 84% y el 94%).

(B) La mayoría de los AON también se probaron por transfección en células de control humanas sanas a concentraciones de 150 y 400 nM. Los resultados se resumen en este diagrama de columnas. Se confirmó que PS188 (SEC ID N°: 5), PS190, PS191 (SEC ID N°: 47), PS193 (SEC ID N°: 48), PS194 (SEC ID N°: 46) y PS196 (SEC ID N°: 51) eran los más eficaces en inducir la omisión del exón 44. Obsérvese que los niveles de omisión del exón 44 en células de paciente normalmente son superiores a en células de control como resultado del hecho de que, a diferencia de las células sanas, en células de paciente la omisión del exón 44 está restaurando el marco, y dando lugar a uno más funcional y estable. No se observó omisión del exón 44 en células de músculo no transfectadas en todos los experimentos (datos no mostrados).

(C) Ejemplos de PS197 (SEC ID N° 52) y tres AON adicionales, PS199 (SEC ID N° 44), PS200 (SEC ID N° 49) y PS201 (SEC ID N° 50), probados similarmente en células de músculo de control, a concentraciones de transfección 150 nM y 400 nM. Los porcentajes de omisión del exón 44 variaron entre el 1% (PS199) y el 44% (PS200). M: Marcador de tamaño de ADN (escala de 100 pb).

Figura 2. Evaluación adicional de PS188 (SEC ID N°: 5) por transfección de células de músculo de control humanas o células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

(A) Experimento de dosis-respuesta. En células de músculo de control humanas, PS188 mostró niveles crecientes de la omisión del exón 44 a dosis de transfección que aumentan de 50 nM a 400 nM (por triplicado), hasta el 45% a 400 nM.

(B) CMSP de un individuo sano se transfectaron con PS188 200 nM. A pesar del hecho de que la distrofina solo se expresa a bajos niveles en este tipo de células, se observó claramente la omisión del exón 44. Estos resultados confirman la eficiencia de PS188 en inducir la omisión del exón 44 del gen de DMD. M: Marcador de

tamaño de ADN.

Figura 3. Evaluación adicional de PS188 (SEC ID N°: 5) por administración a ratones hDMD transgénicos que expresan el gen de DMD humano de longitud completa, y a monos cinomolgos incluidos en amplios estudios de toxicidad.

(A) Tras la inyección intramuscular de 2 x 40 µg de PS188 en ambos músculos gastrocnemios (G1 y G2) de un ratón hDMD, se observó omisión del exón 44, sin embargo a bajos niveles. Esto confirma la capacidad de PS188 para inducir la omisión del exón 44 humano en tejido de músculo *in vivo*. Se esperaron bajos niveles dado el hecho de que este modelo de ratón tiene fibras musculares sanas que muestran normalmente menores niveles de captación de AON cuando se compara con fibras musculares distróficas. NT: en músculo de hDMD no tratado no se observó omisión del exón 44. M: Marcador de tamaño de ADN

(B) En monos incluidos en los estudios de toxicidad en PS188, se observó la omisión del exón 44 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) después de infusiones intravenosas de 1 hora cada cuatro días durante 29 días a un nivel de dosis de 6 mg/kg de PS188. No se observó omisión del exón 44 en monos no tratados (NT). M: Marcador de tamaño de ADN.

Ejemplos

Ejemplo 1

Material y procedimientos

El diseño de AON se basó en solapar (parcialmente) estructuras secundarias abiertas del ARN de exón diana como se predice por el programa de m veces (Mathews y col., J Mol Biol 1999; 288(5): 911-40), en solapar (parcialmente) sitios de unión a proteínas SR putativas por el software ESE-finder (rulai.cshl.edu/tools/ESE/) (Cartegni y col., Nucleic Acids Res 2003; 31(13): 3568-71) y en evitar extensiones de G de 3 o más nucleótidos o pares de CpG. Los AON (véase la Tabla 1) se sintetizaron por Eurogentec (Bélgica) y Prosensa Therapeutics BV (Leiden, Los Países Bajos) y contienen 2'-O-metil-ARN y esqueletos de fosforotioato de longitud completa.

Cultivo de tejido, transfección y análisis por RT-PCR

Se procesaron cultivos de miotubos derivados de un individuo sano ("control humano") o un paciente con DMD con una delección del exón 45 como se ha descrito previamente (Aartsma-Rus y col., Hum Mol Genet 2003; 12(8): 907-14; Havenga y col., J Virol 2002; 76(9): 4612-20). Para el cribado de AON, los cultivos de miotubos se transfectaron con 150 y/o 400 nM de cada AON. Se usó el reactivo de transfección polietilenimina (PEI, ExGen500 MBI Fermentas) o un derivado (UNIFectylin, Prosensa Therapeutics BV, Los Países Bajos), con 2 µl de ExGen500 o UNIFectylin por µg de AON. Se usó un AON de control con una marca de fluoresceína para confirmar las eficiencias de transfección óptimas (normalmente se obtuvieron más del 90% de núcleos fluorescentes). Se aisló ARN 24 a 48 horas después de la transfección como se ha descrito (Aartsma-Rus y col., Neuromuscul Disord 2002; 12 Suppl: S71). Se determinaron las eficiencias de omisión de exones por análisis anidado por RT-PCR usando cebadores en los exones que flanquean el exón 44 (Aartsma-Rus y col., Neuromuscul Disord 2002; 12 Suppl: S71). Se aislaron fragmentos de PCR de geles de agarosa (usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) para la verificación de secuencias (por el Centro de Tecnología del Genoma de Leiden (LGTC) usando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems) y el secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems). Para la cuantificación, los productos de PCR se analizaron usando el kit DNA 1000 LabChips Kit en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EE.UU.).

Resultados

Se diseñaron una serie de AON que se dirigen a secuencias dentro del exón 44 y se probaron tanto en cultivos de miotubos de control sano como derivados de paciente, por transfección y posterior análisis de RT-PCR y de secuencias de ARN aislado. En miotubos derivados de un paciente con DMD con una delección del exón 45, se indujo la omisión del exón 44 específica a 150 nM para cada AON (PS187 a PS201) probado, demostrando PS188 (SEC ID N°: 5), PS190 (previamente publicado como h44AON2, Aartsma-Rus y col., Neuromuscul Disord 2002; 12 Suppl: S71), PS191 (SEC ID N°: 47), PS193 (SEC ID N°: 48), PS194 (SEC ID N°: 46) y PS196 (SEC ID N°: 51) los mayores niveles de omisión (entre el 84% y el 94% a 150 nM) (Fig. 1A).

Se hicieron experimentos de transfección similares en células de control de un individuo sano. Se evaluaron los porcentajes de omisión del exón 44 y se compararon con aquellos en los cultivos celulares de paciente (Fig. 1B). Inherente a la disminución del ARN mediada por antisentido del transcrito de control después de la omisión del exón 44, los porcentajes de control fueron normalmente inferiores a aquellos en las células de paciente (véase, por ejemplo, los resultados con PS197 en la Fig. 1A (células de paciente) frente a la Fig. 1C (células de control).

Se probaron tres AON adicionales PS199 (SEC ID N° 44), PS200 (SEC ID N° 49) y PS201 (SEC ID N° 50) en células de músculo de control, a concentraciones de 150 nM y 400 nM. Los porcentajes de omisión del exón 44 variaron entre el 1% (PS199) y el 44% (PS200) (Fig. 1C). Basándose en todos los experimentos de transfección, los AON PS187, PS188, PS190, PS191, PS192, PS193, PS194, PS196 y PS200 se consideraron los más eficaces, y los

AON PS189, PS197, PS198, PS199 y PS201 los menos eficaces.

PS188 (SEC ID N° 5) se probó adicionalmente en experimentos de dosis-respuesta en células de músculo de control humano sano, aplicando dosis crecientes de 50 a 400 nM por triplicado. Por consiguiente, se observaron niveles de omisión del exón 44 crecientes, hasta el 45% a PS188 400 nM (Figura 2A).

5 Ejemplo 2

Materiales y procedimientos

Una muestra de sangre de control humana sana fresca, recogida en un tubo de EDTA, se dispuso en capas sobre la parte superior de un gradiente de HistoPaque. Tras la centrifugación, la segunda capa (de las cuatro capas, de arriba a abajo) con las células mononucleares se recogió, se lavó y se centrifugó de nuevo. El sedimento de células se resuspendió en medio de cultivo de proliferación y se contó. En una placa de 6 pocillos, se sembraron 8×10^6 células por pocillo y se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ durante 3 h. A continuación, las células se transfectaron con PS188 0 o 200 nM (SEC ID N°: 5; 2'OMePS ARN; Prosensa Therapeutics BV), por duplicado, por placa. Se aisló ARN 72 h después de la transfección, y se analizó por análisis por RT-PCR usando cebadores específicos del gen de DMD que flanquean el exón 44 (Aartsma-Rus y col., Neuromuscul Disord 2002; 12 Suppl: S71). El análisis de secuencias (por el Centro de Tecnología del Genoma de Leiden (LGTC) usando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems) y el secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems) se realizó en productos de PCR aislados (usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) para confirmar la omisión del exón 44 específica sobre el nivel de ARN.

Resultados

En células mononucleares de sangre periférica (CMSP) transfectadas de un individuo sano de control, PS188 indujo la producción de un novedoso fragmento de transcrito más corto cuando se aplicó a 200 nM (Fig. 2B). Este fragmento se aisló y se secuenció y se confirmó debido a la omisión específica del exón 44. En CMSP no transfectadas no se observó omisión del exón 44. Estos resultados indican que PS188 es un compuesto eficaz en inducir la omisión del exón 44 humano *in vitro*.

25 Ejemplo 3

Materiales y procedimientos

Oligorribonucleótidos antisentido (AON)

Se inyectaron ratones normales y mdx (Sicinski y col., (1989). Science 244: 1578-1580) con m46AON4 específico de ratón (van Deutekom y col., (2001) Hum Mol Genet 10: 1547-1554), mientras que los ratones hDMD con PS196 específico de ser humano (SEC ID N° 51) o PS188 (SEC ID N° 5). Ambos AON contuvieron un esqueleto de fosforotioato de longitud completa y moléculas de ribosa modificadas con 2'-O-metilo (PS196: Eurogentec, Bélgica; PS188: Prosensa Therapeutics BV).

Ratones hDMD normales, mdx y transgénicos

Se obtuvieron ratones normales (C57Bl/6NCrL) y ratones mdx (C57Bl/10ScSn-mdx/J) de Charles River Laboratories (Los Países Bajos). Los ratones hDMD transgénicos se manipularon en los propios laboratorios de los inventores de LUMC. Brevemente, células madre embrionarias (ES) se modificaron genéticamente mediante fusiones con esferoplastos de levadura que llevaban un YAC de 2,7 Mb que contuvo el gen de DMD humano de longitud completa (2,4 Mb). Este YAC se reconstruyó previamente por recombinación homóloga de YAC que se solapan más pequeños en levadura (Den Dunnen y col., (1992). Hum Mol Genet 1: 19-28). A continuación, las células ES que muestran la integración de una copia del YAC de tamaño completo, como se ha evaluado por mapeo de PFGE, análisis por PCR de exones a través del gen entero y análisis de FISH de metafase, se usaron para generar ratones hDMD homocigóticos ('t Hoen y col., J. Biol. Chem. 2008). No parece que los ratones hDMD transgénicos estén físicamente afectados por la modificación genética. La expresión apropiada del gen de DMD humano podría demostrarse en músculo, tanto al nivel de ARN como de proteína. La manipulación por ingeniería de estos ratones fue autorizada por el Ministerio holandés de Agricultura (LNV); proyecto n° WA/BD01.284 (E21).

Administración de AON

Los experimentos sobre inyecciones intramusculares de AON en ratones fueron autorizados por la comisión experimental de animales (UDEC) de la Facultad médica de la Universidad de Leiden (proyecto n° 00095, 03027). Se inyectaron AON, tanto puros como complejados con el polímero catiónico polietilenimina (PEI; ExGen 500 (20x), MBI Fermentas) a relaciones de 1 ml de PEI por nmol de AON en una disolución al 5% en peso/volumen de glucosa, o a 15 nmoles de SAINT-18TM (Sinvolux Therapeutics B.V., Los Países Bajos), según las instrucciones del fabricante. El sistema de administración SAINT-18TM se basa en un grupo de cabeza de piridinio catiónico y permite la administración no tóxica de oligonucleótidos antisentido. Se anestesiaron ratones mediante inyección intraperitoneal de una disolución 1:1 (v/v) de Hypnorm/Dormicum (Janssen Pharmaceutical, Bélgica/Roche, Los

Países Bajos). Se administró AON puro (PS188) en un volumen de inyección final de 40 µl mediante inyección intramuscular en ambos músculos gastrocnemios de los ratones usando una jeringa Hamilton con una aguja de 22 de calibre. Los ratones recibieron dos inyecciones de 40 µg a un intervalo de 24 h. Se sacrificaron en diferentes momentos de tiempo después de la inyección; para ratones hDMD inyectados con PS188 diez días después de la última inyección. Se aislaron los músculos y se congelaron en 2-metilbutano enfriado en nitrógeno líquido.

Análisis por RT-PCR

Se homogeneizaron muestras de músculo en disolución de RNA-Bee (Campro Scientific, Los Países Bajos). Se aisló ARN total y se purificó según las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc con la transcriptasa inversa C. therm Polymerase o Transcriptor (Roche Diagnostics, Los Países Bajos), se usaron 300 ng de ARN en una reacción de 20 µl a 60 °C durante 30 min, se cebó de forma inversa con tanto cebadores específicos de ratón como de ser humano. Se realizaron las primeras PCR con conjuntos de cebadores externos (exones flanqueantes 43-45 para ratones inyectados con PS188), durante 20 ciclos de 94 °C (40 s), 60 °C (40 s) y 72 °C (60 s). Entonces se re-amplificó un µl de esta reacción (diluida 1:10) usando combinaciones anidadas de cebadores en los exones que flanquean directamente el exón diana (exón 44 para ratones inyectados con PS188), con 30 ciclos de 94 °C (40 s), 60 °C (40 s) y 72 °C (60 s). Se analizaron los productos de PCR sobre 2% de geles de agarosa. Las eficiencias de omisión se determinaron por cuantificación de productos de PCR usando DNA 1000 LabChip® Kit y el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Los Países Bajos). Previamente se describieron conjuntos y secuencias de cebadores (Aartsma-Rus y col., (2002) *Neuromuscul Disord* 12 Suppl: S71.8.17; van Deutekom y col., (2001) *Hum Mol Genet* 10: 1547-1554).

Análisis de secuencias

Se aislaron productos de RT-PCR de 2% de geles de agarosa usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN). La secuenciación directa de ADN se llevó a cabo por el Centro de Tecnología del Genoma de Leiden (LGTC) usando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems) y se analizó en el secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems).

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Se purificaron homogeneizados de músculo con RNA-Bee usando un kit de purificación de ácidos nucleicos (kit de purificación de ácidos nucleicos para Sequazyme™ Pinpoint SNP Kit, Applied Biosystems) con placas de centrifugación de 96 pocillos (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aplicó disolución de matriz (50 mg/ml de ácido 3-hidroxipicolínico y citrato de amonio dibásico 25 mM en 50% de acetonitrilo) en alícuotas de 1 ml a una diana de muestra AnchorChip™ (Bruker Daltonics, Alemania) y se secó al aire. Las muestras se aplicaron en puntos en alícuotas de 0,5 ml sobre los cristales de la matriz y se secaron al aire. Las determinaciones de masa se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Reflex III (Bruker Daltonics, Alemania). Los espectros se adquirieron en modo de reflector y se acumularon durante aproximadamente 900 disparos de láser. Se analizaron las muestras de m46AON4 marcado y sin marcar para comparación.

Resultados

Omisión de exones en músculo no mutante

Los presentes inventores establecieron primero la omisión de exones elegida como diana en músculo de ratón *in vivo* y optimizaron diferentes parámetros de administración. Se realizaron experimentos iniciales en ratones no mutantes, y, mientras que la disminución del ARN mediada por no sentido produjo la subestimación de las eficiencias de omisión de exones, el efecto de los AON se monitorizó al nivel de ARNm solo. Los presentes inventores inyectaron dosificaciones crecientes de 0,9 nmoles a 5,4 nmoles de cada oligonucleótido antisentido. El análisis por RT-PCR de ARN de músculo total demostró la aparición de un fragmento de transcrito más corto novedoso en todas las muestras inyectadas. El análisis de secuencias confirmó la precisa omisión del exón 44 en este producto (datos no mostrados).

Se analizaron secciones transversales de los músculos contra-laterales inyectados para la dispersión y persistencia de un AON de control marcado con fluoresceína. Tras la inyección de AON puro, los presentes inventores observaron señales fluorescentes dentro de algunas fibras durante hasta una semana. En momentos de tiempo posteriores solo se observaron señales débiles, y principalmente dentro de los espacios intersticiales. El uso de PEI potenció claramente tanto la dispersión como la persistencia de la señal fluorescente, incluso después de 3 semanas. Sin embargo, también indujo la degeneración de fibras y la infiltración de monocitos que absorben la mayoría de la fluorescencia. Usando SAINT, la mayoría de la señal se detectó en los espacios intersticiales durante hasta una semana, que indica que este reactivo no administró eficazmente el AON en las fibras de músculo. Como la señal fluorescente puede no corresponderse con la presencia de AON intactos y funcionales, los presentes inventores realizaron espectrometría de masas de MALDI-TOF de muestras de músculo inyectadas. Los análisis indicaron que la marca fluorescente se eliminó del AON en el plazo de 24 horas. El AON marcado solo fue detectable durante hasta dos semanas si se usa PEI. Los AON intersticiales fueron probablemente más vulnerables a la degradación que los AON intracelulares. El AON sin marcar se observó durante tres a cuatro semanas después de la inyección en las tres series, pero solo puede ser funcional cuando está presente intracelularmente, es decir, en

las series de PEI.

Omisión de exones específica de ser humano en músculo de hDMD

Como la estrategia de omisión de exones es un enfoque terapéutico específico de secuencias, la validación preclínica ideal sería un gen de DMD humano diana, en una población experimental de ratón. Los presentes inventores han manipulado tales ratones DMD “humanizados” (hDMD) transgénicos que llevan una copia integrada y funcional del gen de DMD humano de longitud completa. La expresión de distrofina humana en músculo de ratón hDMD se detectó específicamente por análisis inmunohistoquímico de secciones transversales, usando un anticuerpo específico de ser humano (MANDYS106). Al nivel de ARN de músculo, los análisis de RT-PCR usando tanto cebadores específicos de ratón como de ser humano demostraron la correcta transcripción del gen de DMD humano. Además, tras el cruce con ratones mdx, la construcción de hDMD mostró complementar el defecto distrófico, como se evaluó por análisis histológico y de micromatrices de ADNc (t Hoen y col., J. Biol. Chem. 2008). Los ratones hDMD tienen fibras musculares sanas que normalmente presentan una captación limitada de AON desnudos. Los presentes inventores inyectaron el AON específico de ser humano PS196 (SEC ID N° 51) complejoado con PEI, o PS188 (SEC ID N° 5) sin PEI, en los músculos gastrocnemios de los ratones hDMD (inyecciones 2x40 µg en el plazo de 24 h). 7 a 10 días después de la inyección, los presentes inventores observaron claramente la omisión del exón 44 elegido como diana del transcrito de DMD humano (Fig. 3A). Aunque los AON específicos de ser humano son altamente homólogos a las secuencias de ratón correspondientes, con solo 2 o 3 desapareamientos en los 20-meros respectivos, los transcritos de ratón endógeno no fueron afectados a ningún nivel detectable. PS188 indujo la omisión del exón 44, como se confirma por el análisis de secuencias. No se observó omisión del exón 44 en músculo de hDMD no tratado. Estos resultados indican que PS188 es un compuesto eficaz en inducir la omisión del exón 44 humano en tejido de músculo.

Ejemplo 4

Material y procedimientos

Como parte de un amplio programa de toxicidad para PS188, monos cinomolgos no en ayunas se trataron por infusión intravenosa de 1 hora (5 ml/kg/ h) cada cuatro días durante 29 días al nivel de dosis de 6 mg/kg de PS188 (SEC ID N° 5; 2'OMePS ARN; Agilent Life Sciences, EE.UU.). Las formulaciones de PS188 se prepararon frescas en cada día de tratamiento (en los días de prueba 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25 y 29) poco antes del inicio de la administración (tan pronto como sea posible antes, como máximo en el plazo de una hora antes del inicio de la administración). Se prepararon formulaciones disolviendo PS188 en tampón fosfato; la pureza y contenido de agua se tuvieron en cuenta como se proporciona en el Certificado de Análisis del principio activo. La cantidad de PS188 se ajustó a cada peso corporal actual del animal. Los animales se sacrificaron 96 horas después de la última administración (día 33). Se recogieron muestras de sangre completa (10 ml) en tubos de EDTA y (después del transporte durante la noche a temperatura ambiente) se dispusieron en capas sobre la parte superior de un gradiente de HistoPaque. Tras la centrifugación, la segunda capa (de las cuatro capas, de arriba a abajo) con las células mononucleares se recogió, se lavó y se centrifugó de nuevo. Se aisló el ARN del sedimento de células resultante y se analizó por análisis por RT-PCR usando cebadores específicos del gen de DMD que flanquean el exón 44 (Aartsma-Rus y col., Neuromuscul Disord 2002; 12 Suppl: S71). El análisis de secuencias (por el Centro de Tecnología del Genoma de Leiden (LGTC) usando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems) y el secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems) se realizó en productos de PCR aislados (usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) para confirmar la omisión del exón 44 específica sobre el nivel de ARN.

Resultados

En monos tratados por infusiones intravenosas de 1 hora cada cuatro días durante 29 días al nivel de dosis de 6 mg/kg de PS188, la omisión del exón 44 se observó en células mononucleares de sangre periférica (Fig. 3B), a pesar del hecho de que estas células expresan solo bajos niveles de distrofina. La secuencia de DMD humana y de mono elegida como diana por PS188 es de hecho el 100% idéntica. No se observó omisión del exón 44 en monos no tratados. Estos resultados indican que PS188 es un compuesto eficaz en inducir la omisión del exón 44 *in vivo*.

Tabla 1 Secuencias de oligonucleótidos antisentido.

Tabla 1A

1 (PS188)	UCAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEC ID N° 5
2	UUCAGCUUCUGUUAGCCACU	SEC ID N° 6
3	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEC ID N° 7
4	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID N° 8
5	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID N° 9

(continuación)

6	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID N° 10
7	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID N° 11
8	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID N° 12
9	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID N° 13
10	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N° 14
11	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N° 15
12	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID N° 16
13	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID N° 17
14	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID N° 18
15	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID N° 19
16	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N° 20
17	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N° 21
18	CAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEC ID N° 22
19	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID N° 23
20	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N° 24
21	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N° 25
22	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID N° 26
23	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID N° 27
24	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID N° 28
25	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID N° 29
26	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N° 30
27	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N° 31
28	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N° 32
29	AGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID N° 33
30	GCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N° 34
31	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N° 35
32	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID N° 36
33	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID N° 37
34	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID N° 38
35	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID N° 39
36	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N° 40
37	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N° 41
38	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N° 42
39 (PS 192)	CCAUUUGUAUUUAGCAUGUCCCC	SEC ID N° 43
40 (PS 199)	AGAUACCAUUUGUAUUUAGC	SEC ID N° 44

(continuación)

41 (PS 187)	GCCAUUUCUCAACAGAUUCU	SEC ID N° 45
42 (PS 194)	GCCAUUUCUCAACAGAUUCUGUCA	SEC ID N° 46
43 (PS 191)	AUUCUCAGGAUUUGUGUCUUUC	SEC ID N° 47
44 (PS 193)	UCUCAGGAUUUGUGUCUUUC	SEC ID N° 48
45 (PS 200)	GUUCAGCUUCUGUUAGCC	SEC ID N° 49
46 (PS 201)	CUGAUUAAUAUCUUUAU C	SEC ID N° 50

Tabla 1B

47 (PS196)	GCCGCCAUUUCUCAACAG	SEC ID N° 51
48 (PS 197)	GUAUUUAGCAUGUCCCA	SEC ID N° 52
49 (PS 198)	CAGGAUUUGUGUCUUUC	SEC ID N° 53
50 (PS189)	UCUGUUAGCCACUGAUUAAAU	SEC ID N° 54

5 SEC ID N°: 55 Secuencia de aminoácidos de DMD de *Homo sapiens*

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDLQDGRRLDLLLEGLTG
 QKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQ
 VKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDL
 FDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYTSLFQVLPQQ
 VSIEAIQEVEMLP RP PKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQ
 AAYVTTS DPTRSPFP SQHLEAPEDKSFSGSSLMSEVNLD RYQTAL E EVLSWLLSAEDTLQA
 QGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLS EDETEVQE QM
 NLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLM DLQNK LKELNDWLTKTEERTRKMEEEP L GPDL
 EDLKRQVQKHV LQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWAN
 ICRWTE DRWVLLQDILLKWQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQK
 LAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKS
 TAQISQAVTTTQPSLTQT TVMETVTTVT TREQILVKHAQEELPPPPQKKRQITVDSEIRKRL
 DVDITELHSWITRSEAVLQSPFAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSAQA
 LVEQM VNEG VNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERL NWLEYQNNI AFYNQLQQLEQMT
 TTAENWLKIQTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLDA
 DFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQSETKLSIPQLSVT
 DYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEEIEGRWKK
 LSSQLVEHCQKLEEQMNKL RKIQNHQITLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQC
 RLLVSDIQTIQPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEAL
 KGGLEKT VSLQKDLSEMH EWMTQAE E EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKE
 AKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLTNYQWLCTRLNGKCKTLEE VWACWHEL
 LSYLEKANKWLNVEVEFKLT TENIPGGAE EISEVLD SLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTD
 GGVMDELINEELETFSNRWRELHEEA VRRQKLL EQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLA
 AYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLT SHEISLEEMKKHNQGKEAAQ RVLSQIDVAQKKLQDV
 SMKFR LFQKPANFEQRLQESKMILDEVKMHLPALET KSVEQEVVQS QLNHCVNLYKSLSE
 VKSEVEMVIKTGRQIVQKKQTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLKLSR
 KMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRS AVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITE
 VGEALKTVLGKKETLVEDKLSLLNSNWIAGVTSRAE EWLNLLEYQKHMETF DQNVDHITK
 WIIQADTLLDESEKKKPPQKEDVLKRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLV
 EPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFN SDIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKD
 MNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEIS
 HQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQA EGL
 SEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTE DMPL EISYVP
 STYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDSLQSSGRIDIH SKKT
 AALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQW
 LTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQT VVRTLNATGEEIQQSSKTDASIL

QEKLGSNLNRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGK
 EQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLGKQTNLQWI
 KVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFD
 VQETEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQP
 DLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLS
 LLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIHKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEART
 IITDRIERIQNWDEVQEHLQNRRLQQLNEMMLKLDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKE
 GPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVMITENINAS
 WRSIHKRVSEREAAL EETHRLQQFPLDLEKFLAWL TEAETTANVLQDATRKERLLED SKG
 VKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSEL
 RKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDLSRQAPIGCDFAVQKQNDVHR
 AFKRELKTKPEVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPREL PPEERAQNVTRLLRKQAEV
 NTEWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRAEVIKGSWQPVGDLLIDSL
 QDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVE
 DRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPKNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELY
 QSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRQLKALCLDLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMQDILQIINC
 LTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMLNWLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGHSLSCKAHLEDK
 YRYLFKQVASSTGFCDQRRGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIE
 AALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAACNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQ
 SCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPV
 QTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLND
 ISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGELERILADLEENRNLQ
 AEYDRLKQQHEHKGSLPLSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILED
 HNKQLESQHLRLRLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGE
 EDLLSPQDSTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

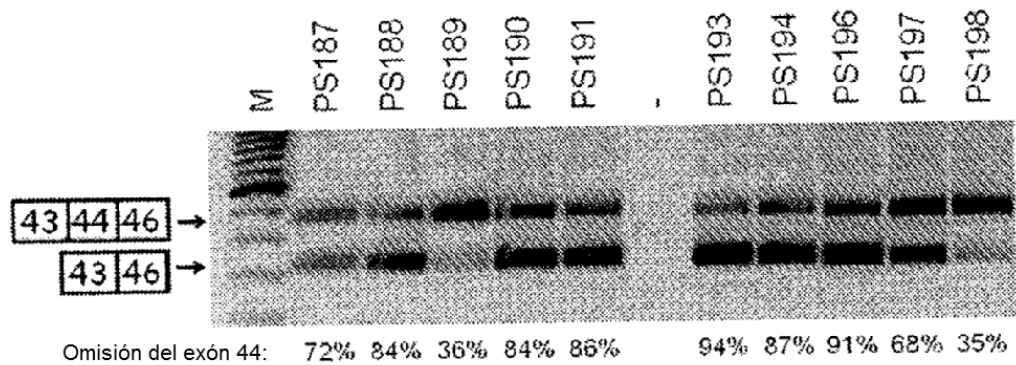
REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido que consiste en la secuencia de 5' ucagcuucuguuagccacug 3' (SEC ID N°: 5).
2. Un oligonucleótido según la reivindicación 1, que es un oligómero de fosforodiamidato morfolino (PMO), un ácido nucleico peptídico (PNA) o un ácido nucleico bloqueado (LNA).
3. Un oligonucleótido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido es un oligorribonucleótido de 2'-O-metil-fosforotioato.
4. Un vector basado en virus, que comprende un casete de expresión dirigido por el promotor Pol III, que expresa un oligonucleótido como se define en la reivindicación 1.
5. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el vector de la reivindicación 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Uso del oligonucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el vector de la reivindicación 4, o la composición farmacéutica de la reivindicación 5 para modular *in vitro* el corte y empalme del pre-ARNm de distrofina.
7. Un oligonucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el vector de la reivindicación 4, o la composición farmacéutica de la reivindicación 5 para su uso como un medicamento para tratar un paciente con DMD o BMD.
8. Un procedimiento *in vitro* para inducir la omisión del exón 44 del pre-ARNm de distrofina en una célula, comprendiendo el procedimiento proveer dicha célula con un oligonucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el vector de la reivindicación 4, o la composición farmacéutica de la reivindicación 5.

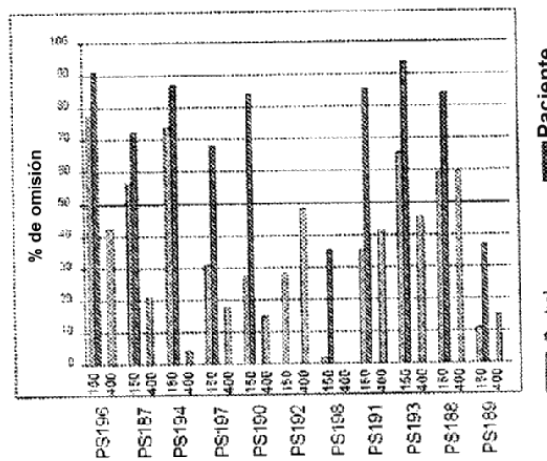
Figura 1

A

Miotubos de paciente con delección del exón 45 de DMD



B



C

Miotubos de control humanos

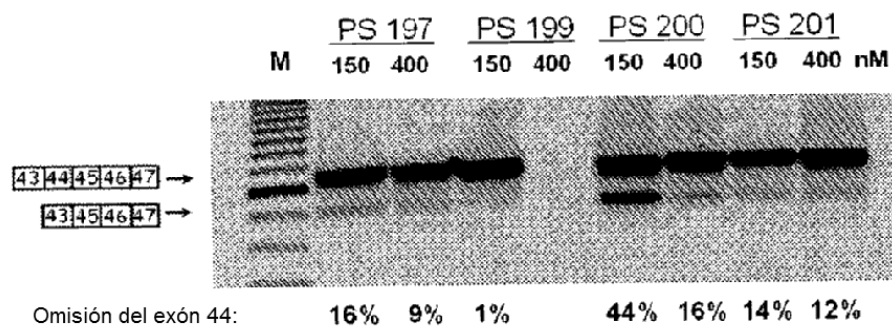
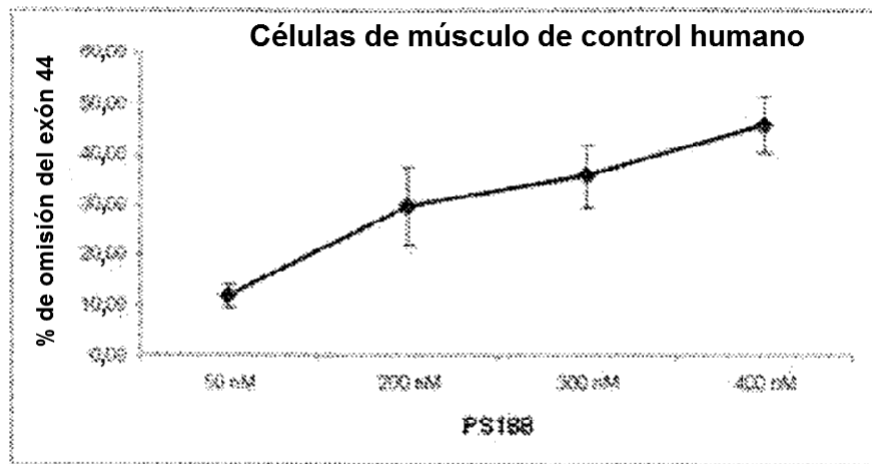


Figura 2

A



B

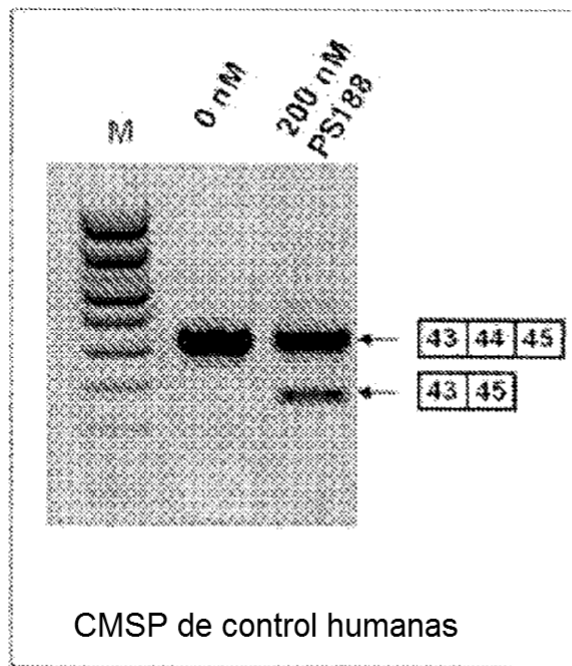
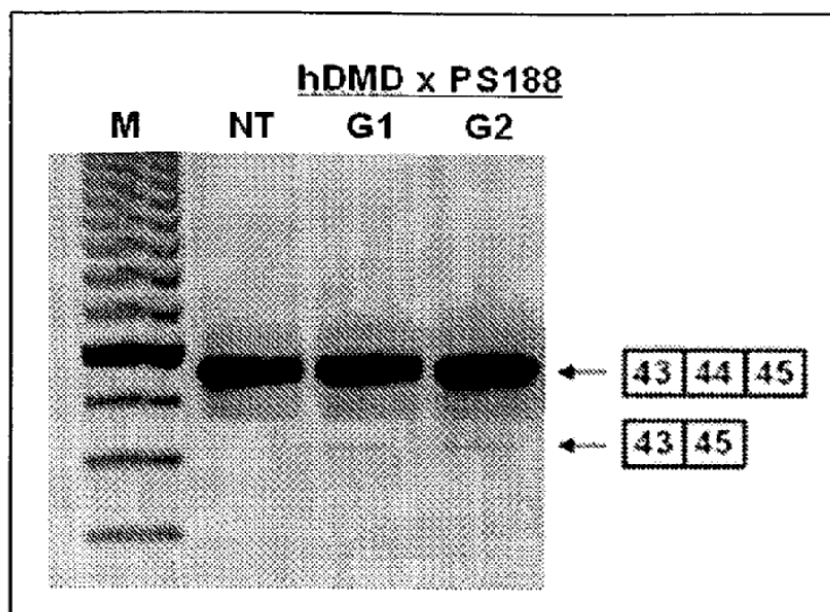


Figura 3

A



B

