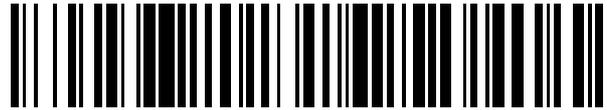


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 294**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2001 E 12198497 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2594642**

54 Título: **Inducción de la omisión de exón en células eucariotas**

30 Prioridad:

21.09.2000 EP 00203283

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

25.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 561 294 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

Inducción de la omisión de exón en células eucariotas

Debido a los rápidos avances en la investigación sobre el genoma humano, los profesionales y el público esperan que el futuro cercano nos traiga (además de la comprensión de los mecanismos de enfermedades y unos diagnósticos refinados y fiables) terapias para muchas enfermedades genéticas devastadoras.

Aunque se espera que, para algunas enfermedades (por ejemplo, metabólicas), este mayor conocimiento alumbre terapias de moléculas pequeñas que se puedan administrar con facilidad, es probable que, en la mayoría de los casos, se requiera en último caso una u otra forma de terapia génica, es decir, la corrección, adición o reemplazamiento del producto génico defectuoso.

En los últimos años, las investigaciones y el desarrollo en este campo han subrayado varias dificultades técnicas que deben solucionarse, por ejemplo, relacionadas con el gran tamaño de muchos genes implicados en enfermedades genéticas (que limitan la elección de sistemas adecuados para administrar el gen terapéutico), la accesibilidad del tejido en el cual debe actuar el gen terapéutico (lo cual requiere del diseño de técnicas de transporte dirigido específico, de modo físico, mediante una inyección restringida, o de modo biológico, desarrollando sistemas con afinidades específicas de tejido), y la seguridad para el paciente del sistema de administración. Estos problemas están interrelacionados en cierta medida y, en general, puede concluirse que cuanto más pequeño sea el agente terapéutico, más fácil será desarrollar sistemas de administración eficaces, dirigidos y seguros.

La presente invención trata este problema induciendo la denominada omisión de exón ("exon-skipping") en células. La omisión de exón produce un ARNm maduro que no contiene el exón omitido y, por tanto, cuando dicho exón codifica aminoácidos, esto puede conducir a la expresión de un producto alterado. La tecnología para la omisión de exón actualmente se dirige al uso de los denominados "oligonucleótidos antisentido" (AON). Muchos de estos trabajos se realizan en el modelo de ratón mdx para la distrofia muscular de Duchenne (DMD). El ratón mdx, que porta una mutación sin sentido en el exón 23 del gen de la distrofina, se ha utilizado como modelo animal de la distrofia muscular de Duchenne. A pesar de la mutación mdx, que debería evitar la síntesis de una proteína de distrofina funcional, se han observado fibras positivas a distrofina en la naturaleza, poco comunes, en el tejido muscular de mdx. Se cree que estas fibras positivas a distrofina surgen de un mecanismo de omisión de exón aparentemente natural, debido a mutaciones somáticas o mediante corte y empalme alternativo. Los AON dirigidos, respectivamente, a los sitios de corte y empalme 3' y 5' de los intrones 22 y 23 en el pre-ARNm de la distrofina han demostrado interferir con factores que normalmente están implicados en la eliminación del intrón 23, de modo que el exón 23 también se elimina del ARNm (Wilton, 1999). En un estudio similar, Dunckley et al. (1998) demostraron que la omisión de exón utilizando AON dirigidos a los sitios de corte y empalme 3' y 5' pueden tener resultados inesperados. Observaron la omisión no solo del exón 23, sino también de los exones 24-29, lo cual produce un ARNm que contiene una zona de unión del exón 22-exón 30. El mecanismo subyacente a la aparición del variante de corte y empalmen 22-30 inesperado no se conoce. Podría ser debido al hecho de que los sitios de corte y empalme contienen secuencias consenso que conducen a la hibridación promiscua de los oligos empleados para dirigir la omisión de exón. Por supuesto, la hibridación de los oligos a otros sitios de corte y empalme diferentes de los sitios del exón que se va omitir podría interferir fácilmente con la precisión del proceso de corte y empalme. Por otra parte, se puede carecer de precisión debido al hecho de que deben emplearse dos oligos (para los sitios de corte y empalme 5' y 3'). Un pre-ARNm que contenga uno, pero no el otro oligo podría ser propenso a variantes de corte y empalme inesperados. Para solucionar estos y otros problemas, la presente descripción proporciona un método para dirigir el corte y empalme de un pre-ARNm en un sistema capaz de realizar una operación de corte y empalme, que comprende poner en contacto dicho pre-ARNm en dicho sistema con un agente capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de al menos un exón en dicho pre-ARNm, y dicho método comprende también permitir el corte y empalme de dicho pre-ARNm. La interferencia con una señal de inclusión de exón (EIS) tiene la ventaja de que dichos elementos están localizados dentro del exón. Si se proporciona un oligo antisentido para el interior del exón que se va a omitir, se puede interferir con la señal de inclusión del exón, ocultando así con eficacia al exón del aparato de corte y empalme. La incapacidad del aparato de corte y empalme para reconocer el exón que se va a omitir conduce así a la exclusión del exón del ARNm final. La presente descripción no interfiere directamente con el proceso enzimático de la maquinaria de corte y empalme (la unión de los exones). Se cree que esto permite que el método sea más robusto y fiable. Se cree que una EIS es una estructura concreta de un exón que permite que el aceptor y el donante del corte y empalme adopten una conformación espacial concreta. Según este concepto, la conformación espacial concreta es lo que permite que la maquinaria de corte y empalme reconozca al exón. Sin embargo, esta descripción desde luego no está limitada a este modelo. Se ha descubierto que ciertos agentes capaces de unirse a un exón pueden inhibir una EIS. Los agentes pueden poner en contacto específicamente dicho exón en cualquier punto y aún ser capaces de inhibir específicamente dicha EIS. Dicho ARNm puede ser útil en sí mismo. Por ejemplo, la producción de una proteína no deseada puede reducirse, al menos en parte, inhibiendo la inclusión de un exón necesario en el ARNm. Preferiblemente, un método de la invención comprende también permitir la traducción del ARNm producido del corte y empalme de dicho pre-ARNm. Preferiblemente, dicho ARNm codifica una proteína funcional. En una realización preferida, dicha proteína comprende dos o más dominios, en los que al menos uno de dichos dominios está codificado por dicho ARNm como resultado de la omisión de al menos parte de un exón en dicho pre-ARNm. La

- omisión de exón en general, pero no necesariamente, será importante para proteínas en la configuración de tipo salvaje que tienen al menos dos dominios funcionales que realizan cada uno una función, en los que dichos dominios se generan de partes diferenciadas de la secuencia de aminoácidos primaria. Un ejemplo son, por ejemplo, los factores de transcripción. Generalmente, estos factores comprenden un dominio de unión a ADN y un dominio que interacciona con otras proteínas en la célula. La omisión de un exón que codifique una parte de la secuencia de aminoácidos primaria que se extienda entre estos dos dominios puede conducir a una proteína más corta que comprenda la misma función, al menos en parte. Así, las mutaciones perjudiciales en esta región intermedia (por ejemplo, mutaciones de desplazamiento de marco o de fin) pueden ser reparadas, al menos en parte, induciendo una omisión de exón para permitir la síntesis de una proteína funcional (parcialmente) más corta. Con el uso de un método de la invención también es posible inducir la omisión parcial del exón. En esta realización, dicho contacto produce la activación de sitios de corte y empalme crípticos en un exón contactado. Esta realización amplía el potencial para la manipulación del pre-ARNm que conduce a una proteína funcional. Preferiblemente, dicho sistema comprende una célula. Preferiblemente, dicha célula se cultiva *in vitro* o en el organismo *in vivo*, y en general, pero no necesariamente, dicho organismo comprende un ser humano o un ratón.
- En una realización preferida, la descripción proporciona un método para disminuir, al menos en parte, la producción de una proteína aberrante en una célula, y dicha célula comprende un pre-ARNm que comprende exones que codifican dicha proteína, comprendiendo dicho método proporcionar a dicha célula un agente capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de al menos uno de dichos exones, y el método comprende también permitir la traducción del ARNm producido por el corte y empalme de dicho pre-ARNm.
- Puede utilizarse cualquier agente capaz de inhibir específicamente una señal de exclusión de exón para la presente descripción. Preferiblemente, dicho agente comprende un ácido nucleico o un equivalente funcional de este. Preferible, pero necesariamente, dicho ácido nucleico está en forma monocatenaria. Los ácidos nucleicos peptídicos y otras moléculas que comprendan las mismas características de unión a ácidos nucleicos en tipo, pero no necesariamente en cantidad, son equivalentes adecuados. El ácido nucleico o un equivalente puede comprender modificaciones para proporcionar funcionalidades adicionales. Por ejemplo, pueden utilizarse oligorribonucleótidos de 2'-O-metilo. Estos ribonucleótidos son más resistentes a la acción de la ARNasa que los oligonucleótidos convencionales.
- En una realización preferida de la invención, dicha señal de inclusión de exón se interfiere con un ácido nucleico antisentido dirigido a una secuencia de reconocimiento de exón (ERS). Estas secuencias son relativamente ricas en purina y pueden distinguirse escrutando la información de la secuencia del exón que se va a omitir (Tanaka et al., 1994, Mol. Cell Biol., 14:pp. 1347-1354). Se cree que las secuencias de reconocimiento de exón ayudan a la inclusión en el ARNm de los denominados exones débiles (Achsel et al., 1996, J. Biochem., 120: pp. 53-60). Estos exones débiles comprenden, por ejemplo, sitios de corte y empalme 5' y/o 3' que son reconocidos con menos eficacia por la maquinaria de corte y empalme. En la presente descripción se ha descubierto que también puede inducirse la omisión de exones en los denominados exones fuertes, es decir, exones que normalmente son reconocidos con eficacia por la maquinaria de corte y empalme de la célula. A partir de cualquier secuencia concreta casi siempre es posible predecir si la secuencia comprende exones putativos y determinar si esos exones son fuertes o débiles. Existen varios algoritmos para determinar la fuerza de un exón. Puede encontrarse un algoritmo útil en el servidor de predicción de sitios de corte y empalme NetGene2 (Brunak, et al., 1991, J. Mol. Biol., 220:pp. 49-65.). Puede inducirse la omisión de exón por medio de la invención en casi cualquier exón, independientemente de que dicho exón sea un exón débil o un exón fuerte, y también independientemente de que dicho exón comprenda una ERS. En una realización preferida, un exón previsto para ser omitido es un exón fuerte. En otra realización preferida, un exón previsto para ser omitido no comprende una ERS.
- Los métodos de la descripción pueden utilizarse de muchas formas. En una realización, se emplea un método de la descripción para disminuir, al menos en parte, la producción de una proteína aberrante. Estas proteínas pueden ser, por ejemplo, oncoproteínas o proteínas víricas. En muchos tumores, no solo la presencia de una oncoproteína, sino también su nivel relativo de expresión, se ha asociado con el fenotipo de la célula tumoral. De modo similar, no solo la presencia de proteínas víricas, sino también la cantidad de proteína vírica en una célula determina la virulencia de un virus concreto. Además, para una multiplicación y propagación eficaz de un virus, el momento de la expresión en el ciclo de vida y el equilibrio en la cantidad de ciertas proteínas víricas en una célula determina si los virus se producen con eficacia o no. Empleando un método de la descripción es posible disminuir la cantidad de proteína aberrante en una célula de modo que, por ejemplo, una célula tumoral se convierta en menos tumorigénica (metastásica) y/o una célula infectada por un virus produzca menos virus.
- En una realización preferida, un método de la descripción se emplea para modificar dicha proteína aberrante para producir una proteína funcional. En una realización, dicha proteína funcional es capaz de realizar una función de una proteína que normalmente está presente en una célula, pero que está ausente en las células que se van a tratar. Muy a menudo, incluso el restablecimiento parcial de la función da como resultado una actuación significativamente mejorada de la célula tratada de esta forma. Debido a la mejor actuación, estas células también pueden presentar una ventaja selectiva frente a células no modificadas, con lo cual se ayuda a la eficacia del tratamiento.
- Este aspecto de descripción resulta particularmente adecuado para el restablecimiento de la expresión de genes defectuosos. Esto se logra provocando la omisión específica de los exones diana, sorteando o corrigiendo

mutaciones perjudiciales (generalmente mutaciones de fin o mutaciones puntuales de desplazamiento de marco, inserciones o deleciones de un único exón o de múltiples exones que conducen a la terminación de la traducción).

Comparada con las estrategias de introducción de genes, esta nueva forma de terapia génica de modulación del corte y empalme requiere la administración de reactivos terapéuticos mucho más pequeños, generalmente, pero sin limitarse a 14-40 nucleótidos. En una realización preferida se emplean moléculas de 14-25 nucleótidos, puesto que estas moléculas son más fáciles de producir y entran en la célula con más eficacia. Los métodos de la invención permiten mucha más flexibilidad en el diseño posterior de sistemas de administración eficaces y seguros. Otra ventaja importante de este aspecto de la invención es que restablece al menos una parte de la actividad del gen endógeno, que todavía posee la mayor parte o toda la circuitería reguladora de genes, asegurando así unos niveles de expresión adecuados y la síntesis de isoformas específicas de tejido.

Este aspecto de la descripción puede aplicarse en principio a cualquier enfermedad genética o predisposición genética a una enfermedad, en la que la omisión dirigida de exones específicos puede restablecer el marco de lectura traduccional cuando este ha sido alterado por la mutación original, con la condición de que la traducción de una proteína internamente un poco más corta aún sea total o parcialmente funcional. Las realizaciones preferidas para las cuales esta aplicación puede tener un valor terapéutico son: la predisposición a mutaciones de segundo evento en genes supresores de tumores, por ejemplo, los implicados en el cáncer de mama, cáncer de colon, esclerosis tuberosa, neurofibromatosis, etc., en los que el restablecimiento (parcial) de la actividad evitaría la manifestación de nulosis por las mutaciones de segundo evento y, así, podría proteger frente a la tumorigénesis. Otra realización preferida implica el restablecimiento (parcial) de productos de genes defectuosos que tienen un efecto directo para provocar una enfermedad, por ejemplo, la hemofilia A (deficiencia en el factor de coagulación VIII), algunas formas de hipotiroidismo congénito (debido a una deficiencia en la síntesis de tiroglobulina) y la distrofia muscular de Duchenne (DMD), en la que las deleciones de desplazamiento de marco, las duplicaciones y las mutaciones de fin en el gen de distrofina ligado a X provocan una grave degradación muscular progresiva. La DMD generalmente es mortal en la adolescencia tardía o la edad adulta temprana, mientras que las deleciones que no provocan desplazamiento de marco o las duplicaciones en el mismo gen provocan la distrofia muscular de Becker (BMD), mucho más suave, que es compatible con una esperanza de vida de entre 35-40 años a normal. En esta realización, aplicada a la DMD, la presente descripción permite la omisión de exón para extender la deleción existente (o alterar el producto de ARNm de una duplicación existente) en todos los exones adyacentes que sean necesarios para restablecer el marco de lectura y generar una proteína internamente un poco más corta, pero aún funcional. Basándose en los síntomas clínicos mucho más suaves de los pacientes con BMD con el equivalente de esta deleción inducida, la enfermedad en los pacientes con DMD tendría un desarrollo mucho más suave después de la terapia con AON.

Muchas mutaciones diferentes en el gen de distrofina pueden conducir a una proteína disfuncional (para un inventario exhaustivo, véase <http://www.dmd.nl>, la base de datos aceptada a nivel internacional para la DMD y otros trastornos relacionados). El exón preciso que se va omitir para generar una proteína de distrofina funcional varía según la mutación. La tabla 1 comprende una lista no limitante de exones que pueden omitirse y lista, para los exones mencionados, algunas de las mutaciones del gen de distrofina que aparecen con mayor frecuencia que se han observado en seres humanos y que pueden tratarse con un método de la invención. La omisión del exón mencionado conduce a una proteína de distrofina mutante que comprende al menos la funcionalidad de un mutante Becker. Así, en una realización, la descripción proporciona un método en el que dicha señal de inclusión de exón está presente en los exones número 2, 8, 19, 29, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52 o 53 del gen de distrofina humano. La aparición de ciertas variaciones de deleción/inserción es más frecuente que otras. En la presente descripción se descubrió que induciendo la omisión del exón 46 con un medio o un método de la descripción pueden tratarse aproximadamente 7% de los pacientes que contienen la deleción DMD, dando como resultado que estos pacientes comprendan fibras musculares positivas a distrofina. Mediante la inducción de la omisión del exón 51 pueden tratarse aproximadamente 15% de los pacientes que contienen la deleción DMD con un medio o un método de la descripción. Este tratamiento dará como resultado que el paciente tenga al menos algunas fibras positivas a distrofina. Así, con la omisión del exón 46 o 51 utilizando un método de la descripción pueden tratarse aproximadamente 22% de los pacientes que contienen una deleción en el gen de distrofina. Así, en una realización preferida de la descripción, dicha señal de exclusión de exón está presente en el exón 46 o en el exón 51. En una realización particular preferida, dicho agente comprende una secuencia de ácido nucleico según hAON#4, hAON#6, hAON#8, hAON#9, AON#11 y/o uno o más de hAON#21-30 o una parte funcional, derivado y/o análogo de dicho hAON#. Una parte funcional, derivado y/o análogo de dicho hAON# comprende la misma actividad de omisión de exón en tipo, en un método de la descripción, pero no necesariamente en cantidad.

Puede resultar ventajoso inducir una omisión de exón en más de un exón en el pre-ARNm. Por ejemplo, considerando la amplia diversidad de mutaciones y la naturaleza fija de las longitudes de los exones y la secuencia de aminoácidos que flanquea a dichas mutaciones, puede producirse la situación de que para restablecer una función, es necesario omitir más de un exón. Un ejemplo preferido, pero no limitante, de dicho caso en la base de datos de deleciones de DMD es una deleción 46-50. Los pacientes que comprenden una deleción 46-50 no producen distrofina funcional. Sin embargo, puede generarse una distrofina al menos parcialmente funcional induciendo la omisión del exón 45 y el exón 51. Otro ejemplo preferido, pero no limitante, son los pacientes que comprenden una duplicación del exón 2. Proporcionando un agente capaz de inhibir una EIS del exón 2 es posible omitir parcialmente uno o más exones dos, regenerando con ello la proteína de tipo salvaje, junto a la proteína con el

exón dos truncado o doble omitido. Otro ejemplo preferido, pero no limitante, es la omisión de los exones 45 a 50. Esto genera un variante similar a Becker dentro de marco. Este variante similar a Becker puede generarse para curar cualquier mutación localizada en los exones 45, 46, 47, 48, 49, y/o 50 o sus combinaciones. En un aspecto, por tanto, la descripción proporciona un método de la descripción que comprende además proporcionar a dicha célula otro agente capaz de inhibir una señal de inclusión de exón en otro exón de dicho pre-ARNm. Por supuesto, el uso de dos o más agentes para la inducción de la omisión de exón en el pre-ARNm de dos o más genes diferentes está completamente dentro del alcance de la invención.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para seleccionar agentes adecuados para la terapia de corte y empalme, y su validación como agentes de omisión de exón específico en experimentos piloto. Se proporciona un método para determinar si un agente es capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de un exón, que comprende proporcionar dicho agente a una célula que porta un pre-ARNm que contiene dicho exón, cultivar dicha célula para permitir la formación de un ARNm a partir de dicho pre-ARNm, y determinar si dicho exón está ausente en dicho ARNm. En una realización preferida, dicho agente comprende un ácido nucleico, o un equivalente funcional de este, y dicho ácido nucleico comprende una complementariedad con una parte de dicho exón. Pueden identificarse agentes capaces de inducir la omisión de exón específica con un método de la descripción. Es posible incluir una preselección de agentes determinando, en primer lugar, si dicho agente es capaz de unirse con una afinidad relativamente alta al ácido nucleico que contiene el exón, preferiblemente ARN. Para este fin, se proporciona un método para determinar si un agente es capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de un exón, que comprende además determinar *in vitro*, en primer lugar, la afinidad de unión relativa de dicho ácido nucleico, o un equivalente funcional de este, con una molécula de ARN que comprende dicho exón.

En otro aspecto, se proporciona un agente que puede obtenerse mediante un método de la descripción. En una realización preferida, dicho agente comprende un ácido nucleico, o un equivalente funcional de este. Preferiblemente, dicho agente, cuando se emplea para inducir la omisión de exón en una célula, es capaz de reducir, al menos en parte, la cantidad de proteína aberrante en dicha célula. Más preferiblemente, dicha omisión de exón produce un ARNm que codifica una proteína que es capaz de realizar una función en dicha célula. En una realización particularmente preferida, dicho pre-ARNm se deriva de un gen de distrofina. Preferiblemente, dicha proteína funcional comprende una proteína de distrofina mutante o normal. Preferiblemente, dicha proteína de distrofina mutante comprende al menos la funcionalidad de una proteína de distrofina en un paciente con Becker. En una realización particularmente preferida, dicho agente comprende la secuencia de ácido nucleico de hAON#4, hAON#6, hAON#8, hAON#9, AON#11 y/o uno o más de hAON#21-30 o una parte funcional, derivado y/o análogo de dicho hAON#. Una parte funcional, derivado y/o análogo de dicho hAON# comprende la misma actividad de omisión de exón en tipo, en un método de la descripción, pero no necesariamente en cantidad.

La técnica describe muchas formas de administrar agentes a células. En particular, los métodos de administración de ácidos nucleicos se han desarrollado mucho. Los expertos en la técnica son capaces de determinar si un método de administración es adecuado para realizar la presente invención. En un ejemplo no limitante, dicho método incluye la encapsulación de un agente de la invención en liposomas, proporcionándose dichos liposomas a células que comprenden un pre-ARNm diana. Los liposomas son particularmente adecuados para la administración de ácidos nucleicos a células. Pueden producirse moléculas antisentido capaces de inducir la omisión de exón en una célula tras la administración de un ácido nucleico que contiene una unidad de transcripción para producir ARN antisentido. Los ejemplos no limitantes de unidades de transcripción adecuadas son las unidades de transcripción de ARN nuclear pequeño (SNRP) o de ARNt. Por tanto, la invención proporciona también un vehículo de administración de ácidos nucleicos que comprende un ácido nucleico, o un equivalente funcional de este, de la invención capaz de inhibir una señal de inclusión de exón. En una realización, dicho vehículo de administración es capaz de expresar dicho ácido nucleico de la invención. Por supuesto, en el caso, por ejemplo, de que se empleen virus monocatenarios como vehículo, se encuentra totalmente dentro del alcance de la invención cuando dicho virus comprende solo la secuencia antisentido de un agente de la invención. En otra realización de virus monocatenarios, los AON de la invención son codificados por unidades de transcripción de ARN nuclear pequeño o ARNt sobre un ácido nucleico vírico encapsulado por los virus como vehículo. Un virus monocatenario preferido es un virus adenoasociado.

En otra realización, la descripción proporciona el uso de un ácido nucleico o un vehículo de administración de ácidos nucleicos de la invención para la preparación de un medicamento. En una realización preferida, dicho medicamento se emplea para el tratamiento de una enfermedad heredada. Más preferiblemente, dicho medicamento se emplea para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

55 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: La delección del exón 45 es una de las mutaciones DMD más frecuentes. Debido a esta delección, el exón 44 se corta para formar el exón 46, el marco de lectura traduccional se interrumpe, y se crea un codón de fin en el exón 46 que conduce a una deficiencia en distrofina. El objetivo de los inventores es inducir artificialmente la omisión de un exón adicional, el exón 46, para restablecer el marco de lectura y restablecer la síntesis de una proteína de distrofina ligeramente más corta, pero en gran medida funcional, como se encuentra en los pacientes con distrofia muscular de Becker, mucho más suave, afectados por una delección en ambos exones 45 y 46.

Figura 2: El exón 46 contiene una región rica en purina de la cual se ha establecido la hipótesis de que desempeña una papel potencial en la regulación de su corte y empalme en el pre-ARNm. Se diseñó una serie de oligorribonucleótidos antisentido (AON) de 2'O-metil-fosforotioato solapantes dirigidos a esta región rica en purina en el exón 46 de la distrofina de ratón. Los AON se diferencian en longitud y en secuencia. Las modificaciones químicas hacen que los AON sean resistentes a endonucleasas y ARNasaH dentro de las células musculares. Para determinar la eficacia de transfección en los estudios *in vitro* de los inventores, los AON contenían un grupo fluoresceína 5' que permite la identificación de células positivas a AON.

Figura 3: Para determinar la afinidad de unión de los diferentes AON al ARN del exón 46 diana, se realizaron ensayos de desplazamiento de la movilidad en gel. En esta figura, se muestran los cinco mAON (mAON#4, 6, 8, 9, y 11) con mayor afinidad por el ARN diana. Después de la unión de los AON al ARN, se forma un complejo que muestra una movilidad en gel retrasada, según puede determinarse mediante el desplazamiento de banda. La unión de los AON a la diana es específica de secuencia. Un mAON aleatorio, es decir, no específico para el exón 46, no generó un desplazamiento de banda.

Figura 4: Los AON específicos de ratón y humano que muestran la mayor afinidad de unión en los ensayos de desplazamiento de la movilidad en gel se transfectaron en cultivos de miotubos de ratón y humanos. (A) Un análisis de RT-PCR muestra un producto truncado, cuyo tamaño se corresponde con el exón 45 directamente cortado y empalmado para producir el exón 47, en cultivos de células de ratón después de la transfección con los diferentes mAON#4, 6, 9, y 11. No se detectó omisión del exón 46 después de la transfección con un AON aleatorio. (B) Un análisis de RT-PCR de cultivos de células musculares humanas derivadas de un individuo no afectado (C) y dos pacientes DMD no relacionados (P1 y P2) reveló productos truncados después de la transfección con hAON#4 y hAON#8. En el control, este producto se corresponde con el exón 45 cortado y empalmado para producir el exón 47, mientras que en los pacientes, el tamaño del fragmento se corresponde con el exón 44 cortado y empalmado para producir el exón 47. No se detectó omisión del exón 46 en los cultivos celulares no transfectados o después de la transfección con un hAON aleatorio. Se obtuvieron las eficacias de omisión del exón 46 más altas con hAON#8.

Figura 5: Los datos de la secuencia de los productos de la RT-PCR obtenidos a partir del paciente DL279.1 (que se corresponde con P1 en la figura 4), que confirman la delección del exón 45 en este paciente (panel superior), y la omisión adicional del exón 46 después de la transfección con hAON#8 (panel inferior). La omisión del exón 46 fue específica, y el exón 44 se cortó y empalmó exactamente para producir el exón 47, que restablece el marco de lectura traduccional.

Figura 6: Análisis inmunohistoquímico del cultivo de células musculares procedentes del paciente DL279.1 después de la transfección con hAON#8. Las células se sometieron a dos anticuerpos de distrofina diferentes, generados contra diferentes regiones de la proteína, localizadas proximalmente (ManDys-1, ex.-31-32) y distalmente (Dys-2, ex. 77-79) del exón diana 46. El panel inferior muestra la ausencia de una proteína de distrofina en los miotubos, mientras que la omisión inducida por hAON#8 del exón 46 claramente restablece la síntesis de una proteína de distrofina, tal como se detecta mediante ambos anticuerpos (panel superior).

Figura 7: (A) Análisis de RT-PCR de ARN aislado a partir de cultivos de células musculares control humanas tratadas con hAON#23, #24, #27, #28, o #29. Se detectó un producto truncado, con un tamaño que se corresponde con el exón 50 cortado y empalmado para producir el exón 52, en células tratadas con hAON#23 y #28. El análisis de la secuencia de estos productos confirmó la omisión precisa del exón 51 (B). Se obtuvo un producto del corte y empalme aberrante adicional en células tratadas con hAON#28 y #29. El análisis de la secuencia reveló la utilización de un sitio de corte y empalme críptico dentro de marco en el interior del exón 51, que se utiliza con baja frecuencia después del tratamiento con AON. El producto generado incluye un exón parcial 51 que también presenta un marco de lectura restablecido, confirmando con ello también el valor terapéutico.

Figura 8: (A) Se realizaron ensayos de desplazamiento de la movilidad en gel para determinar la afinidad de unión de los diferentes h29AON# por el ARN diana del exón 29. Cuando se comparan con ARN no hibridado (ninguno), h29AON#1, #2, #4, #6, #9, #10, y #11 generaron complejos con menor movilidad en gel, lo cual indica su unión al ARN. Un AON aleatorio derivado del exón 19 de la distrofina no generó un complejo. (B) Un análisis de RT-PCR del ARN aislado a partir de cultivos de células musculares control humanas tratadas con h29AON#1, #2, #4, #6, #9, #10, o #11 reveló un producto truncado, cuyo tamaño se corresponde con el exón 28 cortado y empalmado para producir el exón 30. Estos resultados indican que el exón 29 puede omitirse específicamente empleando AON dirigidos a secuencias que están dentro (h29AON#1, #2, #4, o #6) o fuera (h29AON#9, #10, o #11) de la ERS hipotética en el exón 29. Se observó un producto del corte y empalme aberrante adicional que resulta de la omisión del exón 28 y el exón 29 (confirmado mediante datos de secuencias que no se muestran). Aunque este producto también estaba presente en células no tratadas, lo cual sugiere que este evento de omisión alternativa puede aparecer en la naturaleza, el producto resultó potenciado por el tratamiento con AON. El AON 19, derivado del exón 19 de distrofina, no induce la omisión del exón 29. (C) La omisión específica del exón 29 se confirmó mediante los datos de secuencia de los fragmentos de RT-PCR truncados. Aquí se muestra la secuencia obtenida del producto de omisión del exón 29 en células tratadas con h29AON#1.

Figura 9: (A) Análisis de RT-PCR de ARN aislado del músculo gastrocnemio de ratón dos días después de la inyección de 5, 10, o 20 µg de mAON#4, #6, o #11. Se detectaron productos truncados, con un tamaño que se

corresponde con el exón 45 cortado y empalmado para producir el exón 47, en todos los músculos tratados. Las muestras de -RT, -ARN, AD-1, y AD-2 se analizaron como controles negativos para las reacciones de RT-PCR. (B) El análisis de la secuencia de los productos truncados generados por mAON#4 y #6 (y #11, no se muestra) confirmó la omisión precisa del exón 46.

5 **Ejemplos**

Ejemplo de referencia 1

10 Puesto que el exón 45 es uno de los exones que con más frecuencia están deletados en DMD, en un principio el objetivo fue inducir la omisión específica del exón 46 (figura 1). Esto produciría la distrofina más corta, pero en gran medida funcional, que se encuentra en los pacientes BMD que portan una delección de los exones 45 y 46. El sistema en principio se constituyó para la modulación del corte y empalme de pre-ARNm de distrofina del gen de distrofina de ratón. Después el objetivo fue el gen de distrofina humano, con la intención de restablecer el marco de lectura traduccional y la síntesis de distrofina en células musculares procedentes de pacientes DMD afectados por una delección del exón 45.

Diseño de mAON y hAON

15 Se diseñó un serie de AON específicos de ratón y humano (mAON y hAON) dirigidos a una parte interna del exón 46 que contiene un tramo de secuencias ricas en purina, y se establece la hipótesis de que desempeña un papel regulador putativo en el proceso de corte y empalme del exón 46 (figura 2). Para la selección inicial de los AON en los ensayos de desplazamiento de la movilidad en gel (véase a continuación), se utilizaron oligonucleótidos de ADN no modificados (sintetizados por EuroGentec, Bélgica). Para los experimentos de transfección reales en células musculares, se emplearon oligorribonucleótidos de 2'-O-metil-fosforotioato (también sintetizados por EuroGentec, Bélgica). Se sabe que estos oligonucleótidos de ARN modificados son resistentes a endonucleasas y ARNasaH, y que se unen al ARN con alta afinidad. Las secuencias de estos AON que fueron finalmente eficaces y que se aplicaron a células musculares *in vitro* se muestran a continuación. Los correspondientes AON específicos de ratón y humano son altamente homólogos, pero no completamente idénticos.

25 El siguiente listado se refiere a la forma desoxi utilizada para los ensayos, y en los ribonucleótidos de 2-O-metilo que finalmente se emplearon, todas las T deben leerse como U.

mAON#2:	5' GCAATGTTATCTGCTT
mAON#3:	5'GTTATCTGCTTCTTCC
mAON#4:	5' CTGCTTCTTCCAGCC
mAON#5:	5'TCTGCTTCTTCCAGC
mAON#6:	5' GTTATCTGCTTCTTCCAGCC
mAON#7:	5' CTTTTAGCTGCTGCTC
mAON#8:	5' GTTGTCTTTTTAGCTGCTGC
mAON#9:	5' TTAGCTGCTGCTCAT
mAON#10:	5'TTTAGCTGCTGCTCATCTCC
mAON#11:	5' CTGCTGCTCATCTCC
hAON#4:	5' CTGCTTCTTCCAACC
hAON#6:	5' GTTATCTGCTTCTTCCAACC
hAON#8:	5' GCTTTTCTTTTAGTTGCTGC
hAON#9:	5' TTAGTTGCTGCTCTT

hAON#11:

5' TTGCTGCTCTTTTCC

Ensayos de desplazamiento de la movilidad en gel

Se determina la eficacia de los AON mediante su afinidad de unión a la secuencia diana. A pesar de las recientes mejoras en los programas de simulación por ordenador para la predicción del plegamiento del ARN, resulta difícil especular cuáles de los AON diseñados serán capaces de unirse a la secuencia diana con una afinidad relativamente alta. Por tanto, se realizaron ensayos de desplazamiento de la movilidad en gel (según los protocolos descritos en Bruice et al., 1997). El fragmento de ARN del exón 46 diana se generó mediante la transcripción con T7 *in vitro* de un fragmento de PCR (amplificado a partir de ARNm de músculo murino o humano utilizando un cebador sentido que contenía la secuencia del promotor de T7) en presencia de 32P-CTP. La afinidad de unión de los AON individuales (0,5 pmol) por los fragmentos de la transcripción diana se determinó mediante hibridación a 37 °C durante 30 minutos y una posterior electroforesis en gel de poliacrilamida (al 8%). Estos ensayos se realizaron para la selección de AON específicos de ratón y humanos (figura 3). Al menos 5 AON específicos de ratón diferentes (mAON#4, 6, 8, 9 y 11) y cuatro correspondientes AON específicos de humano (hAON#4, 6, 8, y 9) generaron un desplazamiento en la movilidad, lo cual demuestra su afinidad de unión por el ARN diana.

15 Transfección en cultivos de células musculares

Los AON específicos del exón 46 que mostraron la afinidad de unión por la diana más alta en los ensayos de desplazamiento de la movilidad en gel se seleccionaron para el análisis de su eficacia para inducir la omisión de células musculares *in vitro*. En todos los experimentos de transfección se incluyó un AON no específico como control negativo para la omisión específica del exón 46. Tal como se mencionó, el sistema primero se constituyó en células musculares de ratón. Se emplearon cultivos de mioblastos en proliferación y miotubos postmitóticos (que expresan niveles mayores de distrofina) derivados de la línea de células musculares de ratón C2C12. Para los posteriores experimentos en cultivos de células musculares derivadas de humano se emplearon cultivos de células musculares primarias aisladas de biopsias de músculo procedentes de un individuo no afectado y dos pacientes DMD no relacionados que portan una delección del exón 45. Estos cultivos heterogéneos contenían aproximadamente 20-40% de células miogénicas. Se transfectaron los diferentes AON (a una concentración de 1 µM) en las células utilizando el polímero catiónico PEI (MBI Fermentas) a una proporción equivalente de 3. Los AON transfectados en estos experimentos contenían un grupo fluoresceína 5' que permite determinar las eficacias de transfección contando el número de núcleos fluorescentes. Generalmente, más del 60% de las células mostraron una captación nuclear específica de los AON. Para facilitar el análisis de RT-PCR, el ARN se aisló 24 horas después de la transfección utilizando RNAzol B (CamPro Scientific, Países Bajos).

RT-PCR y análisis de la secuencia

El ARN se sometió a transcripción inversa utilizando la polimerasa de *C. therm.* (Roche) y un cebador inverso específico del exón 48. Para facilitar la detección de la omisión del exón 46 de distrofina, el ADNc se amplificó mediante dos rondas de PCR, que incluyen una amplificación anidada empleando cebadores en los exones 44 y 47 (para el sistema humano), o los exones 45 y 47 (para el sistema de ratón). En los cultivos celulares de mioblastos y miotubos de ratón, se detectó un producto truncado cuyo tamaño se corresponde con el exón 45 directamente cortado y empalmado para producir el exón 47 (figura 4). Posteriores análisis de la secuencia confirmaron la omisión específica del exón 46 de estas transcripciones de distrofina de ratón. La eficacia de la omisión de exón fue diferente para los AON individuales, mostrando mAON#4 y #11 la mayor eficacia. Después de estos resultados prometedores, los inventores se centraron en inducir una modulación similar del corte y empalme de la distrofina en cultivos de células musculares derivadas de humano. Así, se detectó un producto truncado en las células musculares control, que se corresponde con el exón 45 cortado y empalmado para producir el exón 47. De modo interesante, en las células musculares derivadas de pacientes, se detectó un fragmento más corto que consiste en el exón 44 cortado y empalmado para producir el exón 47. La omisión específica del exón 46 de las transcripciones de distrofina humana se confirmó mediante los datos de la secuencia. Esta modulación del corte y empalme en la transcripción de distrofina de ratón y humana no se observó en los cultivos celulares no transfectados ni en los cultivos transfectados con un AON no específico.

Análisis inmunohistoquímico

Los inventores quisieron inducir la omisión del exón 46 en células musculares procedentes de pacientes que portan una delección del exón 45, para restablecer la traducción y la síntesis de una proteína de distrofina. Para detectar un producto de distrofina después de la transfección con hAON#8, los dos cultivos de células musculares derivados de pacientes se sometieron a una inmunocitoquímica utilizando dos anticuerpos monoclonales de distrofina diferentes (Mandys-1 y Dys-2) generados contra dominios de la proteína de distrofina localizados a una distancia proximal y distal de la región diana, respectivamente. Los análisis fluorescentes revelaron el restablecimiento de la síntesis de distrofina en ambos cultivos de células derivadas de pacientes (figura 5). Aproximadamente al menos 80% de las fibras se tiñeron positivamente para la distrofina en las muestras tratadas.

Los resultados de los inventores demuestran, por primera vez, el restablecimiento de la síntesis de distrofina a partir del gen DMD endógeno en células musculares procedentes de pacientes DMD. Esto es un estudio demostrativo preliminar de la viabilidad de la modulación dirigida del corte y empalme de pre-ARNm de distrofina para fines terapéuticos.

5 Ejemplo de referencia: Omisión dirigida del exón 51

Omisión simultánea de exones de distrofina

Omisión dirigida del exón 51. Los inventores demostraron la viabilidad de la modulación mediada por AON del corte y empalme del exón 46 de distrofina en células musculares de ratón y humanas *in vitro*. Estos descubrimientos garantizaron posteriores estudios para evaluar los AON como agentes terapéuticos para DMD. Puesto que la mayoría de las deleciones que provocan DMD están agrupadas en dos puntos calientes de mutación, la omisión dirigida de un exón particular puede restablecer el marco de lectura en una serie de pacientes con diferentes mutaciones (véase la tabla 1). El exón 51 es un interesante exón diana. La omisión de este exón es terapéuticamente aplicable a pacientes que portan deleciones que abarcan el exón 50, los exones 45-50, los exones 48-50, los exones 49-50, el exón 52, y los exones 52-63, que incluyen un total de 15% de los pacientes según la base de datos de Leiden.

Se diseñó una serie de diez AON específicos de humano (hAON#21-30, véase a continuación) dirigidos a diferentes regiones ricas en purina dentro del exón 51 de distrofina. Estos tramos ricos en purina sugieren la presencia de un elemento regulador del corte y empalme de exones putativo que los inventores quieren bloquear para inducir la eliminación de ese exón durante el proceso de corte y empalme. Todos los experimentos se realizaron según los protocolos descritos para la omisión del exón 46 (véase anteriormente). Se realizaron ensayos de desplazamiento de la movilidad en gel para identificar los hAON con una alta afinidad de unión por el ARN diana. Se seleccionaron los cinco hAON que mostraron la mayor afinidad. Estos hAON se transfectaron en cultivos de células musculares control humanas para ensayar la viabilidad de la omisión del exón 51 *in vitro*. El ARN se aisló 24 horas después de la transfección, y se generó el ADNc utilizando un cebador inverso específico del exón 53 o 65. Se realizó una amplificación con PCR de la región diana utilizando diferentes combinaciones de cebadores que flanquean al exón 51. La RT-PCR y el análisis de la secuencia revelaron que los inventores fueron capaces de inducir la omisión específica del exón 51 de la transcripción de distrofina humana. Después se transfectaron dos hAON (#23 y 29), que se había demostrado que eran capaces de inducir la omisión del exón, en seis cultivos de células musculares diferentes derivadas de pacientes DMD que portan una de las mutaciones mencionadas anteriormente. La omisión del exón 51 en estos cultivos fue confirmada mediante RT-PCR y análisis de secuencia (figura 7). De manera más importante, los análisis inmunohistoquímicos que emplean múltiples anticuerpos generados contra diferentes partes de la proteína de distrofina demostraron, en todos los casos, que debido a la omisión del exón 51, la síntesis de una proteína de distrofina fue restablecida.

hAON específicos del exón 51:

hAON#21:	5' CCACAGGTTGTGTCACCAG
hAON#22:	5' TTCCTTAGTAACACAGGTT
hAON#23:	5' TGGCATTCTAGTTTGG
hAON#24:	5' CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC
hAON#25:	5' GGTAAGTTCTGTCCAAGCCC
hAON#26:	5' TCACCCTCTGTGATTTTAT
hAON#27:	5' CCCTCTGTGATTTT
hAON#28:	5' TCACCCACCATCACCCCT
hAON#29:	5' TGATATCCTCAAGGTCACCC
hAON#30:	5' CTGCTTGATGATCATCTCGTT

35

Omisión simultánea de múltiples exones de distrofina

La omisión de un exón adicional, tal como el exón 46 o el exón 51, restablece el marco de lectura para un número considerable de diferentes mutaciones de DMD. La gama de mutaciones en las que puede aplicarse esta estrategia

puede aumentar mediante la omisión simultánea de más de un exón. Por ejemplo, en pacientes DMD con una delección del exón 46 para producir el exón 50, solo la omisión de los exones 45 y 51 que flanquean la delección permite el restablecimiento del marco de lectura traduccional.

Ejemplo de referencia: Omisión de exón independiente de ERS

5 Una mutación en el exón 29 conduce a la omisión de este exón en dos pacientes con distrofia muscular de Becker (Ginjaar et al., 2000, EJHG, vol. 8, pp. 793-796). Los inventores estudiaron la viabilidad de dirigir la omisión del exón 29 dirigiendo los AON al sitio de mutación. La mutación está localizada en un tramo rico en purina que puede asociarse con actividad ERS. Los inventores diseñaron una serie de AON (véase a continuación) dirigidos a secuencias dentro (h29AON#1 a h29AON#6) y fuera (h29AON#7 a h29AON#11) de la ERS hipotética. Se realizaron ensayos de desplazamiento de la movilidad en gel (según se describe) para identificar los AON con la mayor afinidad por el ARN diana (figura 8). Después, h29AON#1, #2, #4, #6, #9, #10, y #11 se transfectaron en cultivos de miotubos control humanos utilizando el reactivo de transfección PEI. El ARN se aisló 24 horas después de la transfección, y se generó el ADNc utilizando un cebador inverso específico del exón 31. Se realizó una amplificación con PCR de la región diana utilizando diferentes combinaciones de cebadores que flanquean al exón 29. La RT-PCR y el posterior análisis de la secuencia (figura 8 B, C) revelaron que los inventores fueron capaces de inducir la omisión específica del exón 29 de la transcripción de distrofina humana. Sin embargo, los AON que facilitan esta omisión se dirigieron a secuencias dentro y fuera de la ERS hipotética (h29AON#1, #2, #4, #6, #9, y #11). Estos resultados sugieren que la omisión del exón 29 aparece independientemente de que el exón 29 contenga o no una ERS y que, por tanto, es muy probable que la unión de los AON al exón 29 inactive una señal de inclusión de exón, en lugar de una ERS. Esta prueba de una omisión de exón independiente de ERS puede extender la aplicabilidad global de esta terapia a exones sin ERS.

h29AON#1:	5' TATCCTCTGAATGTCGCATC
h29AON#2:	5' GGTTATCCTCTGAATGTCCG
h29AON#3:	5' TCTGTTAGGGTCTGTGCC
h29AON#4:	5' CCATCTGTTAGGGTCTGTG
h29AON#5:	5' GTCTGTGCCAATATGCG
h29AON#6:	5' TCTGTGCCAATATGCGAATC
h29AON#7:	5' TGTCTCAAGTTCCTC
h29AON#8:	5' GAATTAATGTCTCAAGTTC
h29AON#9:	5' TTAAATGTCTCAAGTTC
h29AON#10:	5' GTAGTTCCTCCAACG
h29AON#11:	5' CATGTAGTTCCTCC

Ejemplo de referencia: Omisión del exón 46 inducida por AON *in vivo* en tejido muscular murino

25 Después de los prometedores resultados en células musculares cultivadas, los inventores ensayaron los diferentes AON específicos del exón 46 de distrofina de ratón *in vivo* inyectándolos, unidos a polietilenoimina (PEI), en el músculo gastrocnemio de ratones control. Con mAON#4, #6, y #11, que previamente habían demostrado ser eficaces en células musculares de ratón *in vitro*, los inventores fueron capaces de inducir la omisión del exón 46 en tejido muscular *in vivo*, según se determina mediante RT-PCR y análisis de la secuencia (figura 9). La omisión *in vivo* del exón 46 fue dependiente de la dosis, produciéndose las mayores eficacias (hasta 10%) después de la inyección de 20 µg por músculo diarios durante dos días consecutivos.

Referencias bibliográficas

Achsel et al., 1996, J. Biochem., 120: pp. 53-60.

Bruice T.W. y Lima, W.F. (1997), Biochemistry, 36(16): páginas 5004-5019.

ES 2 561 294 T3

Brunak et al., 1991, J. Mol. Biol., 220: pp. 49-65.

Dunckley, M.G. et al. (1998), Human molecular genetics, 7: páginas 1083-1090.

Ginjaar et al., 2000, EJHG, vol. 8, pp. 793-796.

Mann et al., 2001, PNAS, vol. 98, páginas 42-47.

5 Tanaka et al., 1994, Mol. Cell Biol., 14: pp. 1347-1354.

Wilton S.D. et al. (1999), Neuromuscular disorders, 9: páginas 330-338.

Los detalles y antecedentes de la distrofia muscular de Duchenne y enfermedades relacionadas pueden encontrarse en el sitio web <http://www.dmd.nl>

Tabla 1

Exón que se va a omitir	Terapéutica para las deleciones DMD (exones)	Frecuencia en http://www.dmd.nl (%)
2	3-7	2
8	3-7	4
	4-7	
	5-7	
	6-7	
43	44	5
	44-47	
44	35-43	8
	45	
	45-54	
45	18-44	13
	46-47	
	44	
	46-48	
	46-49	
	46-51	
	46-53	
46	45	7
50	51	5
	51-55	
51	50	15

Exón que se va a omitir	Terapéutica para las deleciones DMD (exones)	Frecuencia en http://www.dmd.nl (%)
	45-50	
	48-50	
	49-50	
	52	
	52-63	
52	51	
	53	
	53-55	
53	45-52	9
	48-52	
	49-52	
	50-52	
	52	

Aspectos y realizaciones de la descripción

- 5 En un primer aspecto, se proporciona un método para dirigir el corte y empalme de un pre-ARNm en un sistema capaz de realizar una operación de corte y empalme, que comprende poner en contacto dicho pre-ARNm en dicho sistema con un agente capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de al menos un exón en dicho pre-ARNm, y dicho método comprende también permitir el corte y empalme de dicho pre-ARNm.
- Un método preferido comprende también permitir la traducción del ARNm producido por el corte y empalme de dicho pre-ARNm.
- Un método preferido es en el que dicho ARNm codifica una proteína funcional.
- 10 Un método preferido es en el que dicha proteína comprende dos o más dominios, en los que al menos uno de dichos dominios está codificado por dicho ARNm como resultado de la omisión de al menos parte de un exón en dicho pre-ARNm.
- Un método preferido es en el que dicho contacto produce la activación de un sitio de corte y empalme crítico en un exón contactado.
- 15 En un segundo aspecto, se proporciona un método para disminuir, al menos en parte, la producción de una proteína aberrante en una célula, y dicha célula comprende un pre-ARNm que comprende exones que codifican dicha proteína, comprendiendo dicho método proporcionar a dicha célula un agente capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de al menos uno de dichos exones, y el método comprende también permitir la traducción del ARNm producido por el corte y empalme de dicho pre-ARNm.
- 20 Los métodos del primer y segundo aspecto son preferiblemente de modo que dicha señal de inclusión de exón comprende una secuencia de reconocimiento de exón.
- Los métodos del primer y segundo aspecto son preferiblemente de modo que dicha señal de inclusión de exón está presente en un exón que comprende una pareja de donante/aceptor de corte y empalme fuerte.
- 25 Los métodos del primer y segundo aspecto son preferiblemente de modo que dicha traducción produzca una proteína de distrofina mutante o normal, más preferiblemente en el que dicha proteína de distrofina mutante es

equivalente a una proteína de distrofina de un paciente de Becker. En este método preferido, dicha señal de inclusión de exón está presente en el exón número 2, 8, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52 o 53.

5 Los métodos del primer y segundo aspecto son preferiblemente de modo que dicho agente comprende un ácido nucleico o un equivalente funcional de este. Más preferiblemente, dicho ácido nucleico contiene entre 15-25 nucleótidos o un equivalente funcional de este.

Los métodos del primer y segundo aspecto son preferiblemente de modo que comprenden además proporcionar a dicha célula otro agente capaz de inhibir una señal de inclusión de exón presente en otro exón de dicho pre-ARNm.

10 En un tercer aspecto, se proporciona un método para determinar si un ácido nucleico, o un equivalente funcional de este, que comprende complementariedad con una parte de un exón, es capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de dicho exón, que comprende proporcionar dicho ácido nucleico a una célula que porta un pre-ARNm que contiene dicho exón, cultivar dicha célula para permitir la formación de un ARNm a partir de dicho pre-ARNm, y determinar si dicho exón está ausente de dicho ARNm.

Un método preferido del tercer aspecto comprende además determinar *in vitro* la afinidad de unión relativa de dicho ácido nucleico, o un equivalente funcional de este, por una molécula de ARN que comprende dicho exón.

15 En un cuarto aspecto, se proporciona un ácido nucleico, o un equivalente funcional de este, que puede obtenerse mediante un método del tercer aspecto.

En un quinto aspecto, se proporciona un vehículo de transporte de un ácido nucleico, que comprende un ácido nucleico del cuarto aspecto o su complemento.

20 En un sexto aspecto, se proporciona un vehículo de transporte de un ácido nucleico capaz de expresar un ácido nucleico del cuarto aspecto.

En un séptimo aspecto, se proporciona un uso de un ácido nucleico del cuarto aspecto, o un vehículo de transporte de un ácido nucleico del quinto o sexto aspecto, para la preparación de un medicamento.

25 En un octavo aspecto, se proporciona un uso de un ácido nucleico del cuarto aspecto, o un vehículo de transporte de un ácido nucleico del quinto o sexto aspecto, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad heredada o la predisposición a una enfermedad.

En un noveno aspecto, se proporciona un uso de un ácido nucleico, o un equivalente de este, que comprende una cualidad inhibidora de una señal de inclusión de exón, para la preparación de un medicamento.

30 En un décimo aspecto, se proporciona un animal no humano provisto de un ácido nucleico del cuarto aspecto. Preferiblemente, el animal no humano del décimo aspecto comprende además un ácido nucleico que codifica una proteína humana, o un equivalente funcional de este. Aún más preferiblemente, este animal no humano comprende además una mutación silenciadora en el gen que codifica un homólogo animal de dicha proteína humana.

Listado de secuencias

5 <110> Academisch Ziekenhuis Leiden
 <120> Inducción de la omisión de exón en células eucariotas

<130> P6027580EP2

10 <150> PCT/NL01/00697
 <151> 21-09-2001

<150> EP 00203283.7
 <151> 21-09-2000

15 <160> 36

<170> PatentIn versión 3.1

20 <210> 1
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> mouse-specific AON mAON#2

<400> 1

30 gcaatgttat ctgctt 16

<210> 2
 <211> 16
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> AON mAON#3 específico de ratón

40 <400> 2

gttatctgct tcttcc 16

<210> 3
 <211> 15
 <212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> AON mAON#4 específico de ratón

50 <400> 3

ctgcttcttc cagcc 15

55 <210> 4
 <211> 15
 <212> ADN

60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> AON mAON#5 específico de ratón

65 <400> 4

tctgcttctt ccagc 15
 <210> 5
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> AON mAON#6 específico de ratón
 10 <400> 5
 gttatctgct tctccagcc 20
 15 <210> 6
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> AON mAON#7 específico de ratón
 <400> 6
 25 ctttagctg ctgctc 16
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> AON mAON#8 específico de ratón
 35 <400> 7
 gttgttctt tagctgctgc 20
 40 <210> 8
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> AON mAON#9 específico de ratón
 <400> 8
 ttagctgctg ctcac 15
 50 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> AON mAON#10 específico de ratón
 <400> 9
 60 ttagctgct gctcatctcc 20
 <210> 10
 <211> 15
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> AON mAON#11 específico de ratón
 5 <400> 10
 ctgctgctca tctcc 15
 <210> 11
 10 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> AON hAON#4 específico humano
 <400> 11
 ctgcttctc caacc 15
 20 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> AON hAON#6 específico humano
 <400> 12
 30 gttatctgct tctccaacc 20
 <210> 13
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> AON hAON#8 específico humano
 40 <400> 13
 gctttcttt tagtgctgc 20
 45 <210> 14
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> AON hAON#9 específico humano
 <400> 14
 55 ttagtgctg ctctt 15
 <210> 15
 <211> 15
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> AON hAON#11 específico humano
 65 <400> 15

ttgctgctct ttcc 15
 <210> 16
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> hAON#21 específico de Exón-51
 10 <400> 16
 ccacaggttg tgcaccag 19
 15 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> hAON#22 específico de Exón-51
 <400> 17
 25 ttccttagt aaccacaggt t 21
 <210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> hAON#23 específico de Exón-51
 35 <400> 18
 tggcatttct agtttgg 17
 <210> 19
 40 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> hAON#24 específico de Exón-51
 <400> 19
 ccagagcagg tacctccaac atc 23
 50 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> hAON#25 específico de Exón-51
 <400> 20 20
 60 ggtaagttct gtccaagccc 20
 <210> 21
 <211> 19
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> hAON#26 específico de Exón-51
 5 <400> 21
 tcaccctctg tgatttat 19
 <210> 22
 10 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> hAON#27 específico de Exón-51
 <400> 22
 ccctctgga tttt 14
 20 <210> 23
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> hAON#28 específico de Exón-51
 <400> 23
 30 tcaccaccca tcaccct 17
 <210> 24
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> hAON#29 específico de Exón-51
 <400> 24
 tgatatcctc aaggcacc 20
 45 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> hAON#30 específico de Exón-51
 <400> 25
 55 ctgcttgatg atcatctcgt t 21
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> AON h29AON#1 específico humano
 65 <400> 26

tatcctctga atgtcgcatc 20

<210> 27
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> AON h29AON#2 específico humano

10 <400> 27

ggttatcctc tgaatgtgc 20

15 <210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> AON h29AON#3 específico humano

<400> 28

25 tctgtaggg tctgtgcc 18

<210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> AON h29AON#4 específico humano

35 <400> 29

ccatctgta ggtctctg 19

40 <210> 30
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 45 <223> AON h29AON#5 específico humano

<400> 30

gtctgtgcca atatgcg 17

50 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> AON h29AON#6 específico humano

<400> 31

60 tctgtgcaa tatcgaaac 20

<210> 32
 <211> 15
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 561 294 T3

<220>
<223> AON h29AON#7 específico humano

5 <400> 32
tgtctcaagt tcctc 15

<210> 33
10 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> AON h29AON#8 específico humano

<400> 33

20 gaattaaatg tctcaagtc 20

<210> 34
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> AON h29AON#9 específico humano

<400> 34

30 ttaaagtct caagttcc 18

<210> 35
<211> 16
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <223> AON h29AON#10 específico humano

<400> 35

45 gtagttcct ccaacg 16

<210> 36
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> AON h29AON#11 específico humano

<400> 36

55 catgtagttc cctcc 15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un oligonucleótido antisentido dirigido contra el interior del exón 52 del pre-ARNm de distrofina humana, que facilita la ocultación de dicho exón del aparato de corte y empalme, y la exclusión de dicho exón del ARNm final.
- 5 2.- Un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido es capaz de unirse al exón 52, o a parte de este.
- 3.- Un oligonucleótido antisentido según las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho oligonucleótido antisentido es capaz de interferir específicamente con una secuencia de reconocimiento de exón en el exón 52.
- 10 4.- Un oligonucleótido antisentido según las reivindicaciones 2 o 3, en el que la unión al interior del exón 52 se evalúa mediante un ensayo de desplazamiento de la movilidad en gel o determinando si dicho exón está ausente de dicho ARNm.
- 5.- Un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el oligonucleótido induce la omisión específica del exón 52 en un pre-ARNm de distrofina cuando dicho oligonucleótido antisentido está presente en una célula que porta un pre-ARNm que contiene dicho exón.
- 15 6.- Un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 5, en el que el oligonucleótido induce la producción de una proteína de distrofina que comprende al menos la funcionalidad de un mutante de Becker cuando dicho oligonucleótido antisentido está presente en una célula que porta un pre-ARNm que contiene el exón 52.
- 7.- Un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el oligonucleótido tiene una longitud de 14-40 nucleótidos.
- 20 8.- Un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el oligonucleótido es un oligorribonucleótido de 2'-O-metilo o un ácido nucleico peptídico.
- 9.- Un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 8, en el que el oligorribonucleótido de 2'-O-metilo es un oligorribonucleótido de 2'-O-metil-fosforotioato.
- 25 10.- Un vehículo de transporte de un ácido nucleico capaz de expresar un oligonucleótido antisentido, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, preferiblemente en el que dicho vehículo de transporte de un ácido nucleico comprende un virus monocatenario o un virus adenoasociado.
- 11.- El uso de un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o un vehículo de transporte de un ácido nucleico según la reivindicación 10, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne en un paciente.
- 30 12.- El uso según la reivindicación 11, en el que el paciente tratado tiene al menos algunas fibras positivas a distrofina.

Fig 1

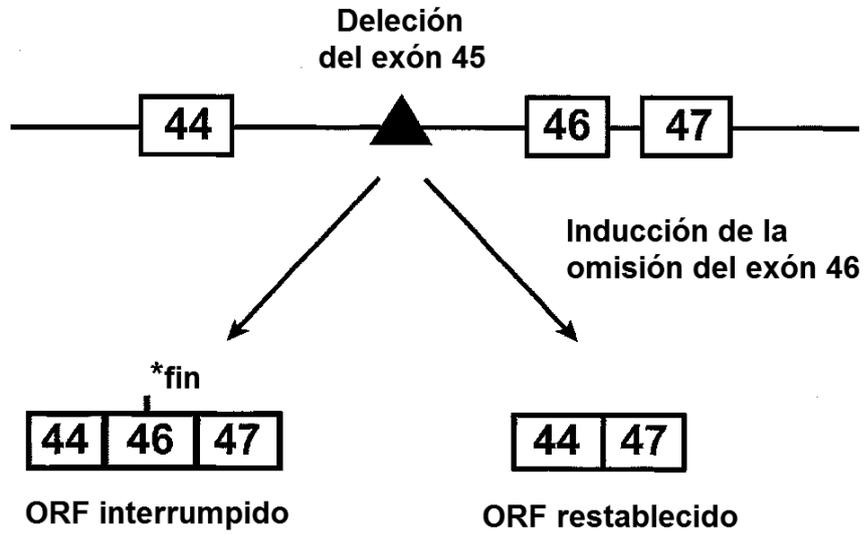
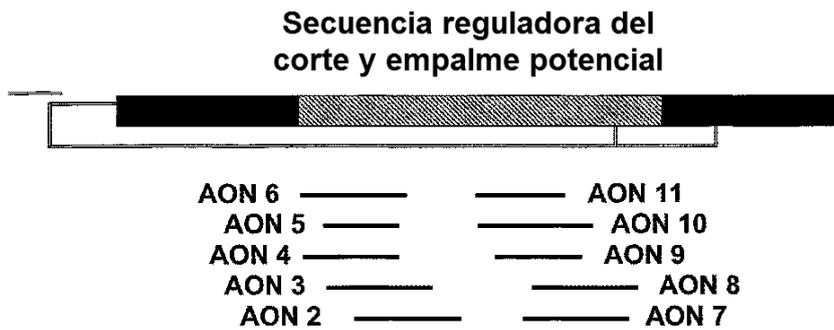


Fig 2

Exón 46 de distrofina



AON: oligorribunucleótidos antisentido

- 1) ARN de 2'-O-metil-fosforotioato
- 2) grupo fluoresceína 5'

Fig 3

**Ensayo de desplazamiento
de la movilidad en gel**

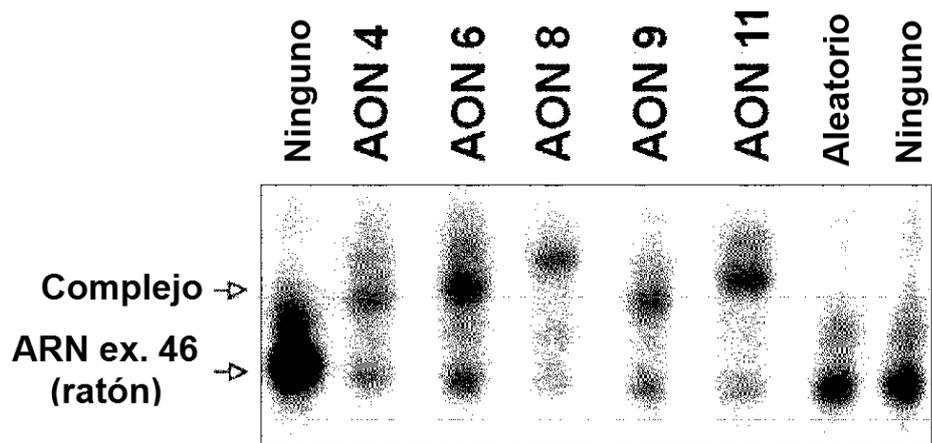


Fig 4a

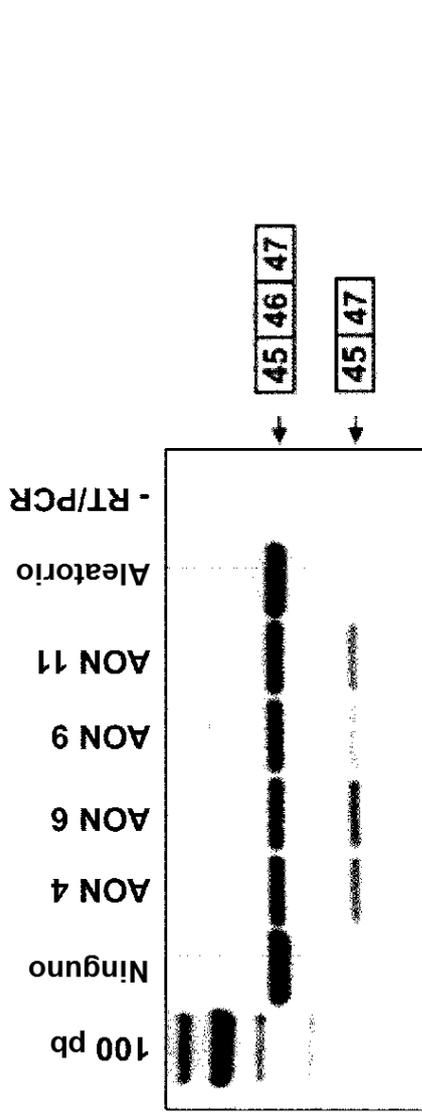


Fig 4b

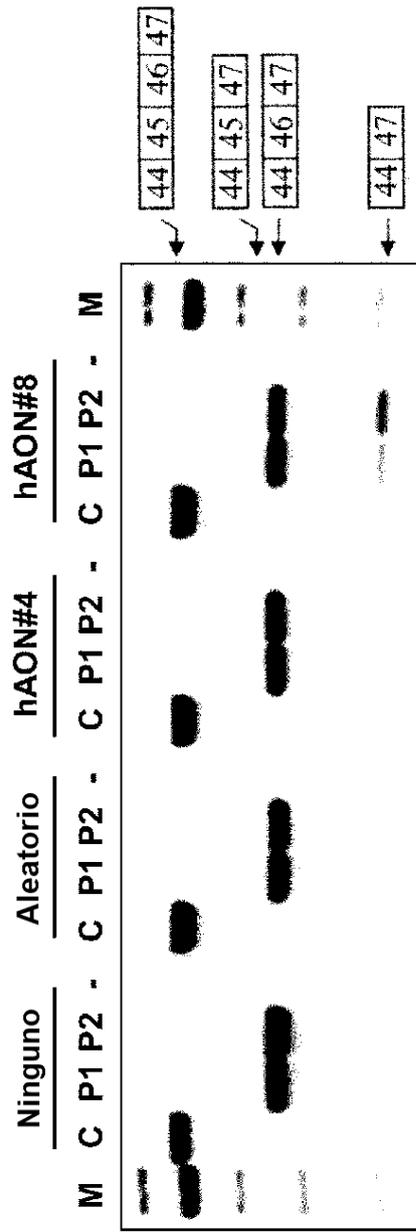


Fig 5

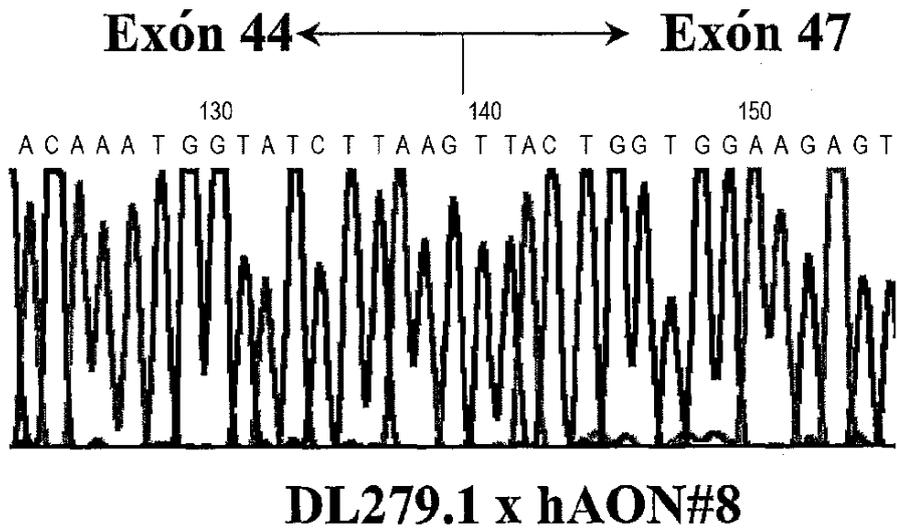
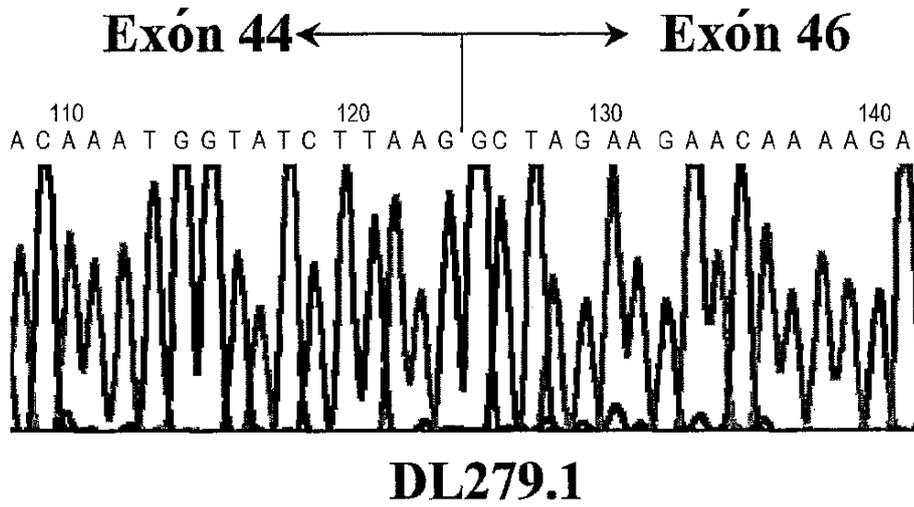
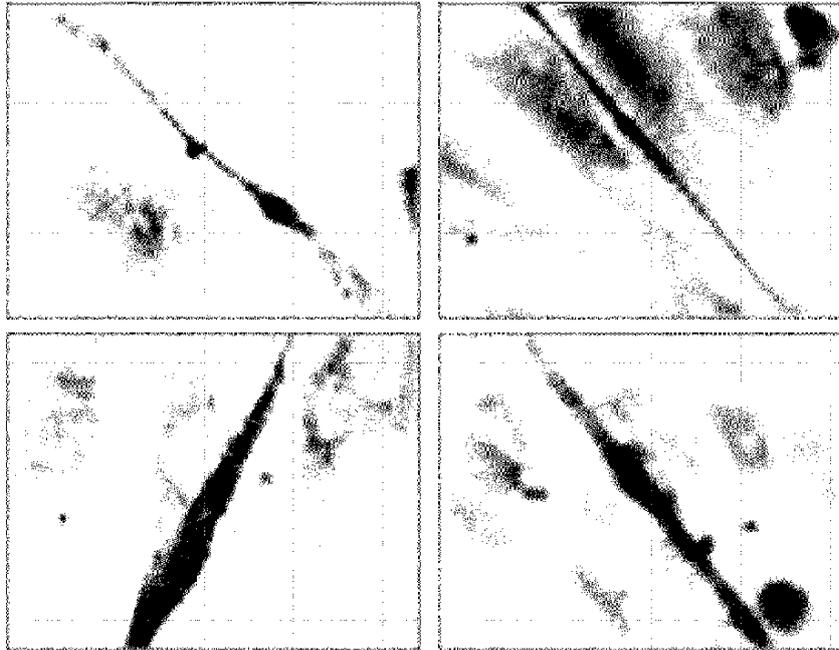


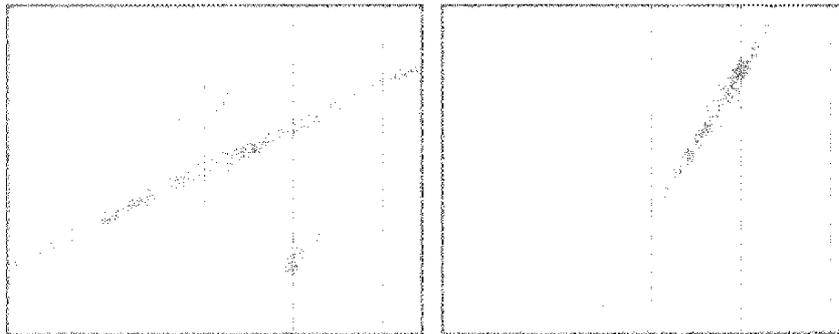
Fig 6

**distrofina
(ex.31-32)**

**distrofina
(ex.77-79)**



DL279.1 x AON#8



DL279.1

Fig 7a

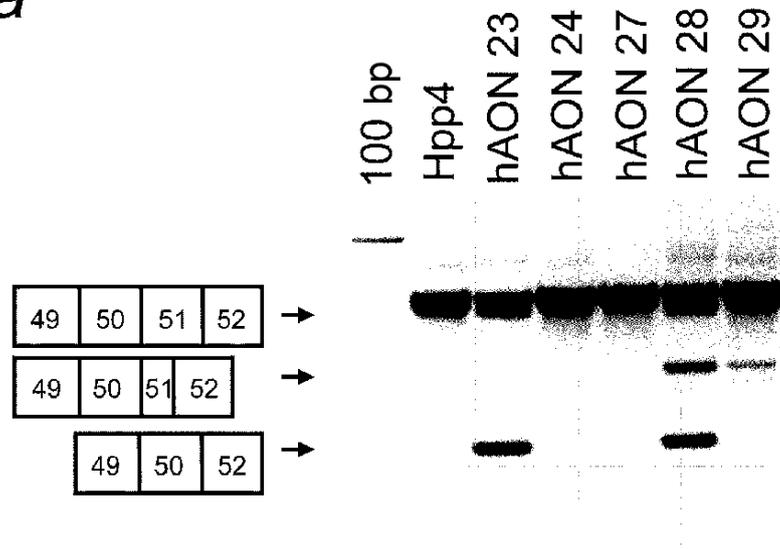


Fig 7b

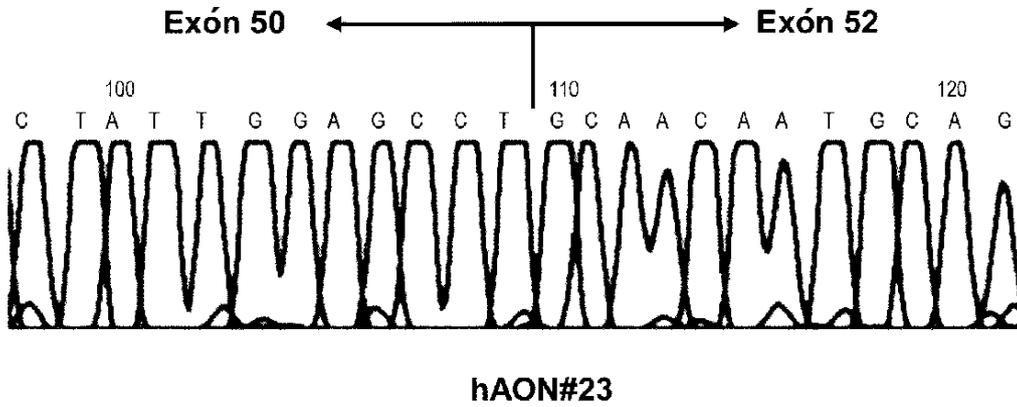


Fig 8a

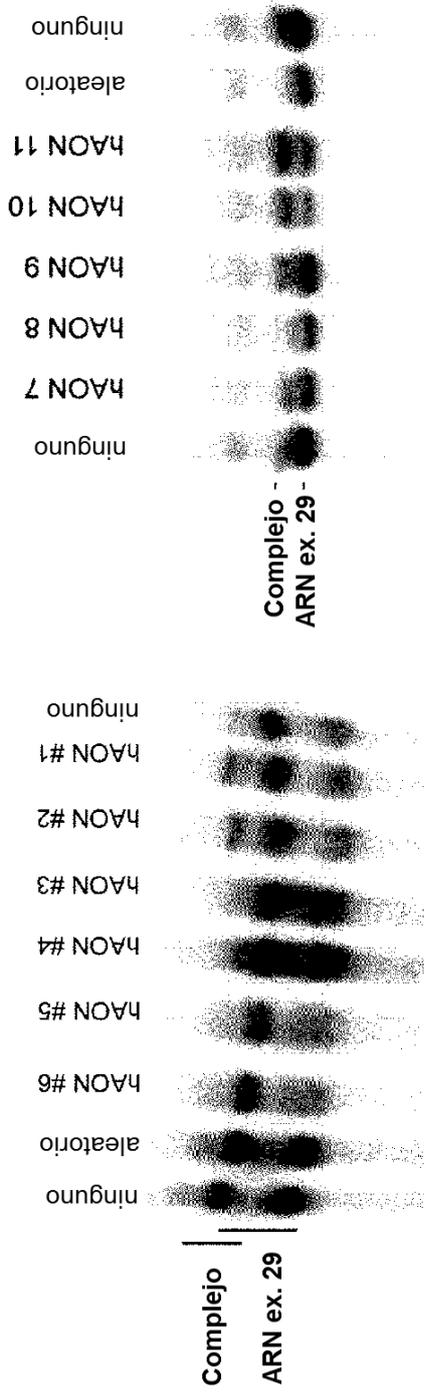


Fig 8b

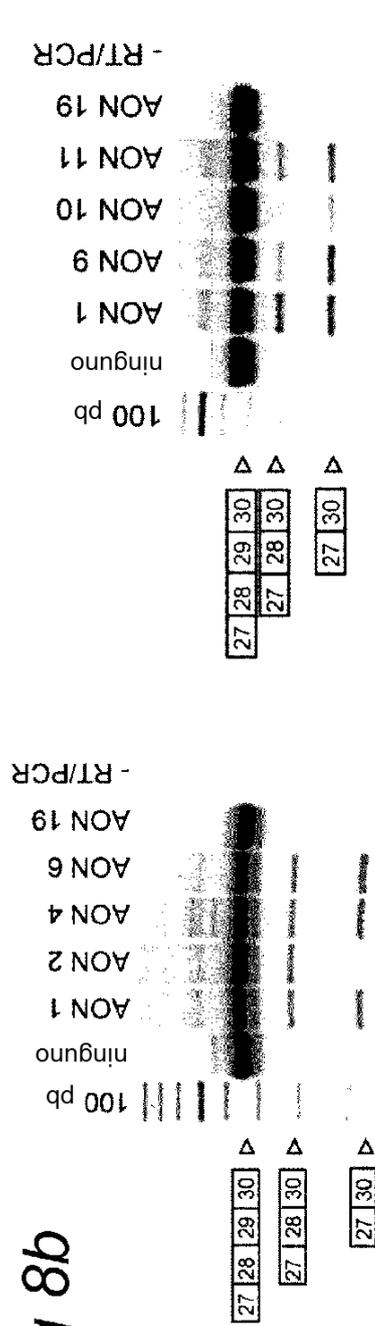


Fig 8c

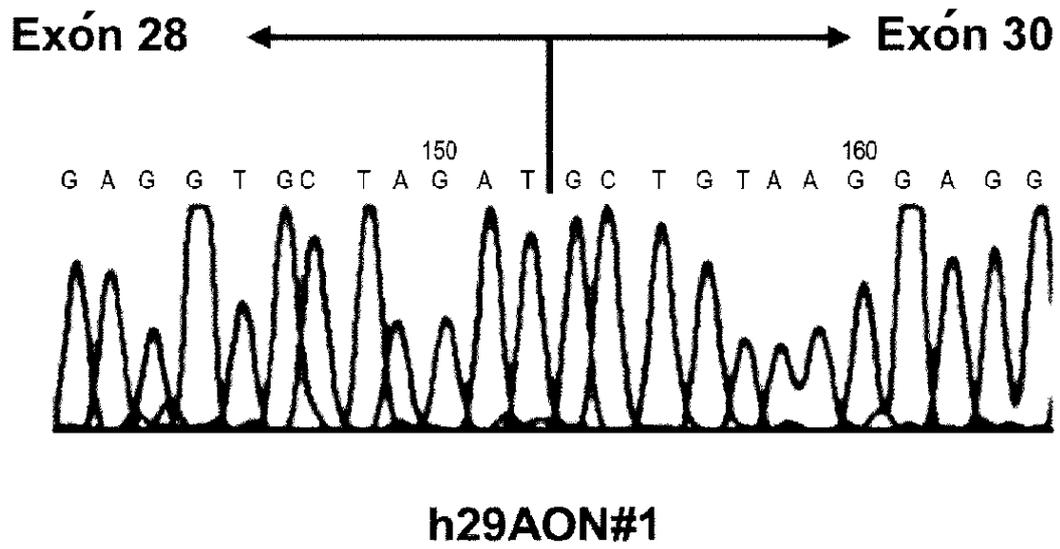


Fig 9A

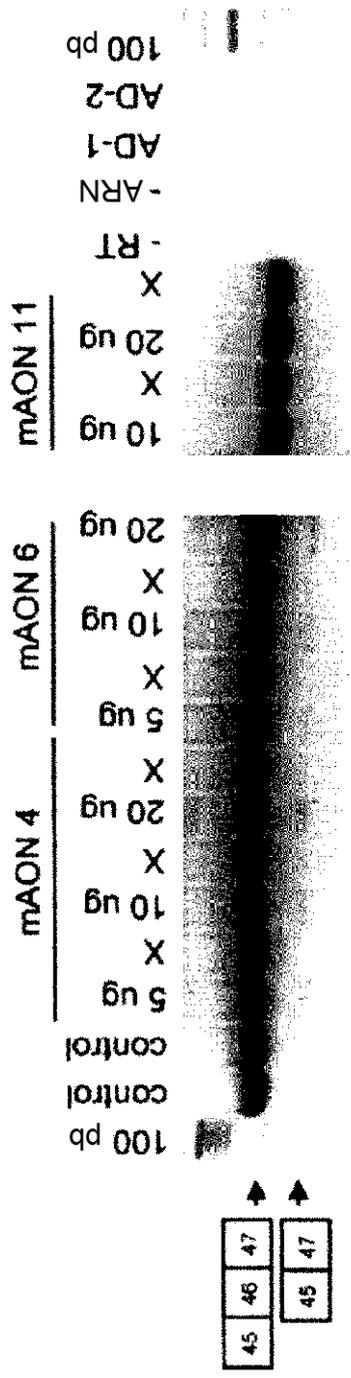


Fig 9B

