

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 917**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2005** **E 12162995 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017** **EP 2500430**

54 Título: **Oligonucleótidos no codificantes para la inducción de la omisión exónica y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

28.06.2004 AU 2004903474

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA
(100.0%)
35 Stirling Highway
Crawley, Western Australia 6009, AU**

72 Inventor/es:

**WILTON, STEPHEN DONALD;
FLETCHER, SUE y
MCCLOREY, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 627 917 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

Oligonucleótidos no codificantes para la inducción de la omisión exónica y métodos de uso de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con nuevos compuestos y composiciones no codificantes adecuados para facilitar la omisión exónica. También proporciona métodos para la inducción de la omisión exónica usando los nuevos compuestos no codificantes así como composiciones terapéuticas adaptadas para el uso en los métodos de la invención.

Antecedentes de la invención

Actualmente se está realizando un esfuerzo significativo en la investigación de métodos para suprimir o compensar mutaciones en genes causantes de enfermedades. Se están desarrollando tecnologías no codificantes usando una serie de procesos químicos para afectar a la expresión génica en una variedad de niveles diferentes (transcripción, corte y empalme, estabilidad, traducción). Gran parte de esa investigación se ha centrado en el uso de compuestos no codificantes para corregir o compensar genes anómalos o asociados con la enfermedad en infinidad de afecciones diferentes.

Las moléculas no codificantes son capaces de inhibir la expresión génica con una especificidad exquisita y, por esta causa, numerosos esfuerzos concentrados en los oligonucleótidos como moduladores de la expresión génica se han centrado en inhibir la expresión de genes diana tales como oncogenes o genes virales. Los oligonucleótidos no codificantes se dirigen, bien contra ARN (cadena codificante) o bien contra ADN, en el que forman estructuras triples que inhiben la transcripción por la ARN polimerasa II. Para lograr un efecto deseado en la regulación génica negativa específica, los oligonucleótidos tienen, bien que promover la degradación del ARNm diana, o bien que bloquear la traducción de ese ARNm, evitando así, de forma eficaz la síntesis *de novo* de la proteína diana no deseada.

Dichas técnicas no son útiles en los casos en que el objetivo es regular positivamente la producción de la proteína nativa o compensar mutaciones que inducen la terminación prematura de la traducción, tales como mutaciones sin sentido o del marco de lectura. Además, en los casos en que una proteína normalmente funcional se termina prematuramente por mutaciones en la misma, se ha demostrado que es posible un medio para la restauración de cierta producción de proteína funcional mediante tecnología no codificante, a través de la intervención durante los procesos de corte y empalme (Sierakowska H, y col., (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 12840-12844; Wilton SD, y col., (1999) Neuromusc Disorders 9, 330-338; van Deutekom JC y col., (2001) Human Mol Genet 10, 1547-1554). En estos casos, el transcrito defectuoso del gen no debería someterse a degradación dirigida para que el proceso químico no codificante no promueva la degradación del ARNm diana.

En una variedad de enfermedades genéticas, los efectos de las mutaciones sobre la expresión final de un gen pueden modularse a través de un proceso dirigido de omisión exónica durante el proceso de corte y empalme. El proceso de corte y empalme está dirigido por una compleja maquinaria multipartícula que lleva a proximidad estrecha a las uniones adyacentes de los exones e intrones en el ARN premensajero y realiza la escisión de los enlaces fosfodiéster de los extremos de los intrones con su posterior reforma entre exones que van a replicarse juntos. Este proceso complicado y de elevada precisión está mediado por motivos de secuencia en el ARN premensajero que son segmentos de relativamente cortos y semiconservados de ARN a los que se unen los diversos factores nucleares de corte y empalme que están implicados después en las reacciones de corte y empalme. Mediante la modificación de la forma en que la maquinaria de corte y empalme lee o reconoce los motivos implicados en el procesamiento del ARN premensajero, es posible crear moléculas de ARNm cortadas y empalmadas de forma diferencial. Actualmente se ha reconocido que la mayoría de los genes humanos se cortan y empalman de forma alternativa durante la expresión génica normal, aunque los mecanismos invocados no se han identificado. Mediante el uso de oligonucleótidos no codificantes, se ha demostrado que los errores y las deficiencias en un ARNm codificado podrían evitarse o eliminarse de los transcritos génicos maduros.

El carácter de la extensión de la eliminación genética u omisión exónica en proceso de corte y empalme no se comprende totalmente, aunque se ha documentado que sucede en muchos casos, generalmente en niveles muy bajos (Sherrat TG, y col., (1993) Am J Hum Genet 53, 1007-1015). Sin embargo, se reconoce que si los exones asociados con mutaciones causantes de enfermedad pueden eliminarse de algunos genes de forma específica, puede producirse a veces un producto proteico acortado que tiene propiedades biológicas similares a la proteína nativa o tiene una actividad biológica suficiente para mejorar la enfermedad causada por las mutaciones asociadas con el exón diana (Lu QL, y col., (2003) Nature Medicine 9, 1009-1014; Aartsma-Rus A y col., (2004) Am J Hum Genet 74: 83-92).

Es probable que este proceso de omisión exónica dirigida sea particularmente útil en genes largos en los que hay numerosos exones e intrones, en los que hay redundancia en la constitución genética de los exones o en los que una proteína es capaz de funcionar sin uno o más exones concretos (p. ej., con el gen de la distrofina, que consta de

79 exones, o posiblemente, algunos genes de colágeno que codifican bloques de secuencia repetidos o los enormes genes de nebulina o titina, que están constituidos de ~80 y más de 370 exones, respectivamente).

Los esfuerzos para redirigir el procesamiento génico para el tratamiento de enfermedades genéticas asociadas con truncamientos causados por mutaciones en diversos genes se han centrado en el uso de oligonucleótidos no codificadores que bien (1) solapan total o parcialmente con los elementos implicados en el proceso de corte y empalme; o bien (2) se unen al ARN premensajero en una posición lo suficientemente cercana al elemento para alterar la unión y la función de los factores de corte y empalme que normalmente mediarían una reacción concreta de corte y empalme que se produce en ese elemento (p. ej., se une al ARN premensajero en una posición a 3, 6, o 9 nucleótidos del elemento que se va a bloquear).

Por ejemplo, la modulación del corte y empalme del ARN premensajero mutante de distrofina con oligonucleótidos no codificantes se ha publicado tanto *in vitro* como *in vivo*. En un tipo de mutación de distrofina publicado en Japón, una mutación por eliminación de 52 pares de bases provoca que durante el proceso de corte y empalme se elimine el exón 19 con los intrones adyacentes (Matsuo y col., (1991) J Clin Invest. 87:2127-2131). Se ha usado un sistema *in vitro* de corte y empalme minigénico para demostrar que un O-metil oligorribonucleótido 31-mérico complementario a la mitad 5' de la secuencia eliminada del exón 19 de distrofina de Kobe inhibía el corte y empalme del ARN premensajero natural (Takeshima y col. (1995), J. Clin. Invest., 95, 515-520). El mismo oligonucleótido se usó para inducir la omisión exónica a partir del transcrito nativo del gen de distrofina en linfoblastos humanos en cultivo.

Dunckley y col., (1997) Nucleosides & Nucleotides, 16, 1665-1668, describieron construcciones *in vitro* para el análisis de corte y empalme alrededor del exón 23 de distrofina mutada en el ratón mutante *mdx*, un modelo de distrofia muscular. Se discutieron los planes para analizar estas construcciones *in vitro* usando oligonucleótidos modificados en 2' dirigidos a los sitios de corte y empalme dentro y adyacentes al exón 23 de distrofina de ratón, aunque no se dio ningún sitio ni secuencia diana.

Posteriormente, se publicó que los 2'-O-metil oligorribonucleótidos corrigen la deficiencia de distrofina en mioblastos del ratón *mdx* de este grupo. Se publicó que un oligonucleótido no codificante dirigido al sitio de corte y empalme en 3' del intrón 22 de la distrofina murina causaba la omisión del exón mutante así como de varios exones adyacentes y creaba un nuevo transcrito de distrofina en fase con una nueva eliminación interna. Esta distrofina mutada se expresó en 1-2 % de los miotubos de *mdx* con tratamiento no codificante. Se describe el uso de otras modificaciones de oligonucleótidos tales como 2'-O-metoxietilfosfodiésteres (Dunckley y col. (1998) Human Mol. Genetics, 5, 1083-90).

Por tanto, las moléculas no codificantes pueden proporcionar una herramienta para el tratamiento de trastornos genéticos tales como la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Sin embargo, los intentos para inducir omisión exónica usando moléculas no codificantes han tenido un éxito desigual. Errington y col. (2003) J Gen Med 5, 518-527 describen estudios sobre el exón 19 de distrofina, en los que se logró con éxito la omisión de ese exón del ARN premensajero de distrofina usando una variedad de moléculas no codificantes dirigidas a los sitios adyacentes de corte y empalme o a motivos dentro del exón implicados en la definición del exón.

En contraposición con la aparente facilidad de omisión del exón 19, actualmente se considera que la primera publicación de la omisión del exón 23 en el ratón *mdx*, por Dunckley y col., (1998) informa únicamente de un transcrito revertiente que aparece de forma natural, o de un artefacto más que de cualquier actividad no codificante verdadera. Además de no generar de forma sistemática transcritos sin el exón 23, Durickley y col., (1998) no demostraron en ningún momento la trayectoria de la omisión del exón, ni siquiera la titulación de oligonucleótidos no codificantes, para demostrar efectos dependientes de dosis en los que los niveles de omisión exónica se correspondieran con cantidades crecientes o decrecientes de oligonucleótido no codificante. Además, este trabajo no pudo ser reproducido por otros investigadores.

El primer ejemplo de omisión exónica específica y reproducible en el modelo de ratón *mdx* fue publicado por Witton y col. (1999) Neuromuscular Disorders 9, 330-338. Dirigiendo una molécula no codificante al sitio de corte y empalme donante, se indujo una omisión eficaz y sistemática del exón 23 en el ARNm de la distrofina a las 6 horas de tratamiento de las células cultivadas. Wilton *et al.*, (1999), también describen la dirección hacia la región aceptora del ARN premensajero de la distrofina de ratón con oligonucleótidos no codificadores más largos y su incapacidad de repetir los resultados publicados por Dunckley y col. (1998). No pudo detectarse de manera reproducible ninguna omisión exónica, ni del 23 solo, ni de la eliminación múltiple de varios exones adyacentes usando una selección de oligonucleótidos no codificantes dirigidos hacia el sitio de corte y empalme aceptor del intrón 22.

Aunque el primer oligonucleótido no codificante dirigido al sitio de corte y empalme donante del intrón 23 inducía la omisión sistemática de exones en mioblastos en cultivo primario, se encontró que este compuesto era mucho menos eficaz en cultivos de células inmortalizadas que expresaban niveles más elevados de distrofina. Sin embargo, con una definición del objetivo y un diseño de oligonucleótidos no codificantes perfeccionados, la eficacia de la eliminación específica del exón aumentó casi en un orden de magnitud (véase Mann CJ y col., (2002) J Gen Med 4, 644-654).

Otras divulgaciones relacionadas con la terapia de la DMD incluyen el documento CA 2507125, Aartsma-Rus et al., Human Molecular Genetics 12, (2003) 907-14, Aartsma-rus y col., Neuromuscular Disorders, 12 (2002) 71-7, así como el documento WO 2004/083446, publicado el 30 de septiembre de 2004.

5 Por tanto, sigue habiendo una necesidad de proporcionar oligonucleótidos no codificantes capaces de unirse y de modificar el corte y empalme de una secuencia diana de nucleótidos. La simple dirección de los oligonucleótidos no codificadores hacia motivos que se supone que son cruciales para el corte y empalme no es una garantía de la eficacia de dicho compuesto en un ámbito terapéutico.

10 Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona un oligonucleótido no codificante que se une al ARN premensajero de la distrofina humana, en la que dicho oligonucleótido tiene una longitud de 17 a 30 nucleótidos y es hibridable de forma específica con una región diana del exón 50 del gen de la distrofina designada como sitio de apareamiento H50D (+07-18), en la que dicho oligonucleótido no codificante es un oligonucleótido morfolino no codificante, y, en la que dicho oligonucleótido induce la omisión del exón 50.

20 La invención proporciona además una composición que comprende un oligonucleótido no codificante de acuerdo con la invención y una solución salina que incluye un tampón fosfato.

La invención proporciona además un oligonucleótido no codificante de acuerdo con la invención, o una composición de acuerdo con la invención, para su uso en un método de tratamiento de la distrofia muscular.

25 La invención se define más en las reivindicaciones acompañantes.

30 La elección de la selección diana juega un papel crucial en la eficacia de la omisión del exónica y, por lo tanto, en su posterior aplicación de una terapia potencial. El simple diseño de moléculas no codificantes hacia regiones diana de ARN premensajero que se supone que están implicadas en el corte y empalme no es una garantía de inducción de omisión exónica eficaz y específica. Las dianas más obvias o más fácilmente definidas para la intervención en el corte y empalme son los sitios donantes y aceptores de corte y empalme, aunque hay motivos menos definidos o conservados que incluyen potenciadores exónicos de corte y empalme, elementos silenciadores y puntos de ramificación.

35 Los sitios donantes y aceptores de corte y empalme tienen secuencias de consenso de alrededor de 16 y 8 bases respectivamente (véase la figura 1 para la representación esquemática de los motivos y dominios implicados en el reconocimiento exónico, la eliminación de intrones y el proceso de corte y empalme).

40 La invención también aborda el uso de oligonucleótidos no codificantes purificados y aislados de la invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad genética.

La invención puede usarse para tratar una afección caracterizada por la distrofia muscular de Duchenne, mediante la administración a un paciente con necesidad de tratamiento de una cantidad eficaz de un oligonucleótido no codificante diseñado apropiadamente de la invención, importante para la lesión genética particular en ese paciente.

45 Además, la invención puede usarse para tratar de forma profiláctica a un paciente para prevenir o, al menos, minimizar la distrofia muscular de Duchenne, comprendiendo la etapa de: administración al paciente de una cantidad eficaz de un oligonucleótido no codificante o de una composición farmacéutica que comprende una o más de estas moléculas biológicas.

50 También se describen en el presente documento *kits* para el tratamiento de una enfermedad genética, *kits* que comprenden al menos un oligonucleótido no codificante de la presente invención, envasados en un recipiente adecuado y las instrucciones para su uso.

55 Otros aspectos y ventajas de la invención se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la revisión subsiguiente, que procede con referencia a las siguientes figuras.

Breve descripción de los dibujos

60 Figura1. Representación esquemática de los motivos y dominios implicados en el reconocimiento de exones, la eliminación de intrones y el proceso de corte y empalme.

65 Figura 2. Representación gráfica del concepto de omisión exónica inducida por oligonucleótido no codificante para evitar mutaciones causantes de enfermedad (no dibujado a escala). La caja sombreada representa un exón portador de una mutación que evita la traducción a proteína del resto del ARNm. La barra negra compacta representa un oligonucleótido no codificante que evita la inclusión de ese exón en el ARNm maduro.

Breve descripción de los listados de secuencias

5 Tabla 1: Descripción de los 2'-O-metil fosforotioato oligonucleótidos no codificantes que se han usado hasta la fecha para estudiar la omisión exónica inducida durante el procesamiento del ARN premensajero de la distrofia. Dado que estos 2'-O-metil fosforotioato oligonucleótidos no codificantes son más de tipo ARN, la U representa uracilo. Con otros procesos químicos no codificantes tales como ácidos peptidonucleicos o morfolidos, estas bases U pueden mostrarse como "T".

SEC ID	SECUENCIA	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS (5'-3')
173	H50A(+02+30)	CCA CUC AGA GCU CAG AUC UUC UAA CUU CC
174	H50A(+07+33)	CUU CCA CUC AGA GCU CAG AUC UUC UAA
175	H50D(+07-18)	GGG AUC CAG UAU ACU UAC AGG CUC C

10 Descripción detallada de la invención

General

15 Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento admite otras variaciones y modificaciones, además de las descritas específicamente. Se entiende que la invención incluye todas las variaciones y modificaciones dichas. La invención también incluye todas las etapas, aspectos, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o se indican en la especificación, de forma individual o colectiva y a cualquiera y a todas las combinaciones o a dos o más etapas o aspectos cualesquiera.

20 Las realizaciones específicas descritas en el presente documento, que están pensadas con fines únicamente de ejemplo, no han de limitar el enfoque de la presente invención. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del enfoque de la invención, como se describe en el presente documento.

25 Los números de identificación de secuencias (SEC ID N°:) que contienen información de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos incluidos en esta especificación se recopilan al final de la descripción y se han preparado usando el programa PatentIn, versión 3.0. Cada secuencia de nucleótidos o aminoácidos está identificada en el listado de secuencias mediante el indicador numérico <210> seguido de un identificador de secuencia (p. ej. <210>1, <210>2, etc.). La longitud, el tipo de secuencia y el organismo de origen para cada secuencia de nucleótidos o aminoácidos se indican mediante la información proporcionada en los campos de indicador numérico <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos a las que se hace referencia en la especificación se definen mediante la información proporcionada en el campo de indicador numérico <400> seguido del identificador de secuencia (p. ej. <400>1, <400>2, etc.).

35 Se ha propuesto y se ha publicado un sistema de nomenclatura de moléculas no codificantes para distinguir entre las diferentes moléculas no codificantes (véase Mann y col., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Esta nomenclatura se hizo especialmente importante al ensayar varias moléculas no codificantes ligeramente diferentes, dirigidas todas hacia la misma región diana, como se muestra a continuación:

40 **H # A/D (x : y).**

La primera letra designa la especie (p. ej., H: humana, M: murina, C: canina)

45 "#" designa el número del exón diana de la distrofina.

"A/D" indica sitio de corte y empalme donante o aceptor al principio y al final del exón, respectivamente.

(xy) representa las coordenadas de apareamiento, en las que "-" o "+" indican secuencias intrónicas o exónicas respectivamente. Como ejemplo, A(-6+18) indicaría las últimas 6 bases del intrón que precede al exón diana y las primeras 18 bases del exón diana. El sitio de corte y empalme más cercano sería el aceptor, de modo que estas coordenadas irían precedidas por una "A". La descripción de coordenadas de apareamiento en el sitio de corte y empalme donante podría ser D(+2-18) en el que las últimas 2 bases exónicas y las primeras 18 bases intrónicas corresponden al sitio de apareamiento de la molécula no codificante. Coordenadas de apareamiento totalmente exónico podrían representarse mediante A(+65+85), que es el sitio entre el 65º y el 85º nucleótido a partir del comienzo de ese exón.

55 No se hace admisión alguna sobre que alguna de las referencias bibliográficas constituya técnica previa o sea parte del conocimiento común general de quienes trabajan en el campo con el que se relaciona la invención.

Tal como se usa necesariamente en el presente documento la expresión "procedente" y "procedente de" se tomarán para indicar que puede obtenerse un entero específico a partir de una fuente concreta, aunque no directamente a partir de esa fuente.

5 A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un entero o grupo de enteros establecidos poro no la exclusión de cualquier otro entero o grupo de enteros.

10 Otras definiciones para los términos seleccionados usados en el presente documento pueden encontrarse dentro de la descripción detallada de la invención y aplicarse a lo largo de ella. A menos que se defina otra cosa, todos los demás términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención.

15 Descripción de la realización preferida

15 Cuando se dirigen molécula(s) no codificante(s) hacia las secuencias de nucleótidos implicadas en el corte y empalme en exones dentro de las secuencias de ARN premensajero, el corte y empalme normal del exón puede inhibirse y causar que la maquinaria de corte y empalme evite los exones mutados enteros del ARNm maduro El concepto de omisión exónica inducida por oligonucleótido no codificante se muestra en la figura 2. En muchos genes, la eliminación de un exón entero conduciría a la producción de una proteína no funcional a través de la pérdida de dominios funcionales importantes o de la alteración del marco de lectura. En algunas proteínas, sin embargo, es posible acortar la proteína mediante la eliminación de uno o más exones, sin alterar el marco de lectura, a partir del interior de la proteína sin alterar seriamente la actividad biológica de la proteína. Típicamente, dichas proteínas tienen un papel estructural o poseen dominios funcionales en sus extremos. La presente invención describe moléculas no codificantes capaces de unirse a ARN premensajeros diana específicos de distrofina y redirigir el procesamiento de ese gen.

Moléculas no codificantes

30 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporcionan moléculas no codificantes como se define en las reivindicaciones, capaces de unirse a una diana seleccionada para inducir omisión exónica. Para inducir omisión exónica en los exones del transcrito del gen de la distrofina, las moléculas no codificantes se seleccionan preferentemente de entre el grupo de compuestos que se muestra en la tabla 1. También se describe una combinación o "cóctel" de dos o más oligonucleótidos no codificantes capaces de unirse a una diana seleccionada para inducir omisión exónica.

40 El diseño de moléculas no codificantes para enmascarar completamente los sitios de corte y empalme de consenso puede no generar necesariamente alguna omisión del exón seleccionado como diana. Además, los inventores han descubierto que el tamaño o la longitud del propio oligonucleótido no codificante no siempre es un factor principal cuando se diseñan moléculas no codificantes. Con algunas dianas, tales como el exón 19, oligonucleótidos no codificantes de tan solo 12 bases fueron capaces de inducir omisión exónica, aunque no de forma tan eficaz como oligonucleótidos más largos (de 20-31 bases). En algunas otras dianas, tales como el exón 23 de distrofina murina, oligonucleótidos no codificantes de solo 17 restos de longitud fueron capaces de inducir una omisión más eficaz que otro compuesto solapante de 25 nucleótidos.

45 Los inventores también han descubierto que no parece que haya ningún motivo convencional que pueda bloquearse o enmascararse mediante moléculas no codificantes para redirigir el corte y empalme. En algunos exones, tales como el exón 23 de la distrofina de ratón, el sitio de corte y empalmen donante fue el más abierto como diana para redirigir la omisión de ese exón. Hay que destacar que el diseño y el ensayo de una serie de moléculas no codificantes específicas del exón 23 para aparearse con regiones solapantes del sitio de corte y empalme donante mostró una variación considerable en cuanto a la eficacia de la omisión exónica inducida. Como publican Mann y col., (2002) hubo una variación significativa en la eficacia para evitar la mutación sin sentido dependiente del apareamiento de oligonucleótidos no codificantes ("Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy". J Gen Med 4: 644-654). No se encontró que la dirección hacia el sitio acceptor del exón 23 o a ciertos dominios internos indujera una omisión sistemática del exón 23.

60 En otros exones definidos como diana para la eliminación, el enmascaramiento del sitio de corte y empalme donante no indujo ninguna omisión exónica. Sin embargo, dirigiendo moléculas no codificantes al sitio de corte y empalme acceptor (exón 8 humano), se indujo una omisión exónica fuerte y mantenida. Hay que destacar que la eliminación del exón 8 humano estuvo fuertemente asociada con la eliminación conjunta del exón 9. No hay una fuerte homología de secuencia entre los oligonucleótidos no codificantes del exón 8 y las regiones correspondientes del exón 9, de modo que no parece que sea una cuestión de reacción cruzada. Más bien, el corte y empalme de estos dos exones está unido de forma inextricable. Éste no es un caso aislado, ya que se observa el mismo efecto en células caninas en las que la definición como diana del exón 8 para su eliminación también dio como resultado la omisión del exón 9. La definición como diana del exón 23 para su eliminación en el ARN premensajero de la distrofina del ratón también da como resultado, además, la eliminación frecuente del exón 22. Este efecto se

produce de una manera dependiente de la dosis y también indica un procesamiento estrechamente coordinado de dos exones adyacentes.

5 En otros exones definidos como diana, las moléculas no codificantes dirigidas hacia los sitios de corte y empalme donantes o aceptores no indujeron omisión exónica, mientras que el apareamiento de moléculas no codificantes con regiones intraexónicas (es decir, potenciadores del corte y empalme exónico dentro del exón 6 de la distrofina humana) fue más eficaz en la inducción de omisión exónica. Algunos exones, por ejemplo, el exón 19, tanto de ratón como humano, son fácilmente omitidos mediante la dirección de moléculas no codificantes hacia una variedad de motivos. Esto es, la omisión exónica dirigida se induce después del uso de oligonucleótidos no codificantes para enmascarar los sitios de corte y empalme donante y aceptor o potenciadores del corte y empalme exónico.

10 Para identificar y seleccionar oligonucleótidos no codificantes adecuados para su uso en la modulación de la omisión de exones, hay que identificar primero una secuencia de ácido nucleico cuya función sea ser modulada. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión esté asociada con un trastorno o estado patológico concreto, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. Dentro del contexto de la presente invención, el/los sitio(s) diana preferido(s) son aquellos implicados en el corte y empalme del ARNm (es decir, sitios de corte y empalme donantes, sitios de corte y empalme aceptores, o elementos potenciadores del corte y empalme exónico). Los puntos de ramificación de corte y empalme y las secuencias de reconocimiento o los potenciadores del corte y empalme exónicos también son potenciales sitios diana para la modulación del corte y empalme del ARNm.

15 Preferentemente, la presente invención se propone proporcionar moléculas no codificantes capaces de unirse a una diana seccionada en el ARN premensajero de la distrofina para inducir una omisión exónica eficaz y sistemática. La distrofia muscular de Duchenne surge a partir de mutaciones que imposibilitan la síntesis de un producto funcional del gen de la distrofina. Estos defectos genéticos de la distrofia muscular de Duchenne son típicamente mutaciones sin sentido o reordenamientos genómicos tales como eliminaciones, duplicaciones o microeliminaciones o inserciones que alteran el marco de lectura. Como el gen de la distrofina humana es un gen largo y complejo con los 20 79 exones que se cortan y empalman a la vez para generar un ARNm maduro con un marco de lectura abierto de aproximadamente 11.000 bases, hay muchas posiciones en las que pueden producirse estas mutaciones. En consecuencia, una terapia extensa basada en oligonucleótidos no codificantes para abordar muchas de las diferentes mutaciones causantes de enfermedad en el gen de la distrofina requerirá que puedan definirse como diana numerosos exones para su eliminación durante los procesos de corte y empalme.

25 Dentro del contexto de la presente invención, el/los sitio(s) diana preferido(s) son aquellos implicados en el corte y empalme del ARNm (es decir, sitios de corte y empalme donantes, sitios de corte y empalme aceptores o elementos potenciadores del corte y empalme exónico). Los puntos de ramificación de corte y empalme y las secuencias de reconocimiento o los potenciadores del corte y empalme exónicos también potenciales sitios diana para la modulación del corte y empalme del ARNm.

30 El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí ocupan un número suficiente de las posiciones correspondientes en cada molécula. Por tanto, "hibridable de forma específica" y "complementario" son expresiones que se usan para indicar un grado de complementariedad de apareamiento preciso tal que se produzca una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el ADN o ARN diana.

35 Se entiende en la técnica que la secuencia de una molécula no codificante no necesita ser complementaria al 100 % a la de su secuencia diana para ser hibridable de forma específica. Una molécula no codificante es hibridable de forma específica cuando la unión del compuesto a la molécula diana de ADN o ARN interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para causar una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión inespecífica del compuesto no codificante a secuencias no diana en condiciones en las cuales se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones en las cuales se realizan los ensayos

40 Aunque el método anterior puede usarse para seleccionar moléculas no codificantes capaces de eliminar cualquier exón del interior de una proteína que es capaz de acortarse sin afectar a su función biológica, la eliminación del exón no debería conducir a un cambio del marco de lectura en el ARNm transcrito acortado. Por tanto, si en una secuencia lineal de tres exones, el final del primer exón codifica dos o tres nucleótidos en un codón y el siguiente exón se elimina, entonces, el tercer exón de la secuencia lineal ha de empezar con un solo nucleótido que sea capaz de completar el triplete de nucleótidos para un codón. Si el tercer exón no comienza con un solo nucleótido, habrá un cambio del marco de lectura que conduciría a la generación de una proteína truncada o no funcional.

45 Se apreciará que los reordenamientos de codón al final de los exones en proteínas estructurales puede no romperse siempre al final de un codón, en consecuencia, puede haber una necesidad de eliminar más de un exón del ARN premensajero para asegurar la lectura dentro del marco del ARNm. En tales circunstancias, puede ser necesario seleccionar una pluralidad de oligonucleótidos no codificantes mediante el método de la invención en el que cada uno se dirija hacia una región diferente responsable de la inducción de corte y empalme en los exones que se van a eliminar.

La longitud de una molécula no codificante puede variar siempre y cuando sea capaz de unirse de forma selectiva a la localización planeada dentro de la molécula de ARN premensajero. La longitud de dichas secuencias puede determinarse de acuerdo con los procesos de selección descritos en el presente documento. Generalmente, la molécula no codificante será desde alrededor de 10 nucleótidos de longitud hasta alrededor de 50 nucleótidos de longitud. Se apreciará, sin embargo, que puede usarse en el método cualquier longitud de nucleótidos dentro de este intervalo. Preferentemente, la longitud de la molécula no codificante está entre 17 a 30 nucleótidos de longitud.

A fin de determinar cuáles exones pueden estar conectados en un gen de distrofina, debería hacerse referencia a un mapa de límites exónicos. La conexión de un exón con otro está basada en los exones que poseen el mismo número en el límite 3' que el que está presente en el límite 5' del exón al que se está conectando. Por tanto, si se eliminase el exón 7, el exón 6 ha de conectar con los exones 12 o 18 para mantener el marco de lectura. Por tanto, es necesario seleccionar los oligonucleótidos no codificantes que redirigieron el corte y el empalme para los exones 7 a 11 en el primer caso, o los exones 7 a 17 en el segundo caso. Otro planteamiento, en cierto modo más simple, para restaurar el marco de lectura alrededor de una eliminación del exón 7 sería eliminar los dos exones adyacentes. La inducción de la omisión de los exones 6 y 8 daría como resultado un transcrito dentro del marco con el corte y empalme de los exones 5 a 9. En la práctica, sin embargo, la definición del exón 8 como diana para la eliminación del ARN premensajero da como resultado la eliminación conjunta del exón 9, de modo que el transcrito resultante tendría el exón 5 unido al exón 10. La inclusión o exclusión de exón 9 no altera el marco de lectura. Una vez que se han identificado las moléculas no codificantes que se van a ensayar, se preparan de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica. El método más común para producir moléculas no codificantes es la metilación de la posición 2' hidroxirribosa y la incorporación de una cadena principal de fosforotioato produce moléculas que superficialmente se asemejan al ARN pero son mucho más resistentes a la degradación por nucleasas.

Para evitar la degradación de ARN premensajero durante la formación de híbridos con las moléculas no codificantes, las moléculas no codificantes usadas en el método pueden adaptarse para reducir al mínimo o evitar la escisión por ARNasa H endógena. Esta propiedad se prefiere mucho, ya que el tratamiento del ARN con los oligonucleótidos no metilados, bien de forma intracelular o bien en extractos sin procesar que contengan ARNasa H conduce a la degradación del ARN premensajero: híbrido de oligonucleótidos no codificantes. Cualquier forma de moléculas no codificantes modificadas que sea capaz de evitar o no inducir dicha degradación puede usarse en el presente método. Un ejemplo de moléculas no codificantes que cuando forman híbridos con el ARN no son escindidas por la ARNasa H son los derivados del 2'-O-metilo. Los 2'-O-metil-oligorribonucleotidos son muy estables en un entorno celular y en tejidos animales, y sus híbridos con el ARN tienen valores de Tm más elevados que sus ribo- o desoxirribo- equivalentes.

Pueden fabricarse moléculas no codificantes que no activan ARNasa H de acuerdo con técnicas conocidas (véase, p. ej., la patente de EE.UU. 5.149.797). Dichas moléculas no codificantes, que pueden ser secuencias de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, contienen, simplemente, cualquier modificación estructural que obstaculice o evite de forma estérica la unión de la ARNasa H a una molécula híbrida que contenga el oligonucleótido como un miembro de la misma, cuya modificación estructural no obstaculice de forma sustancial o altere la formación de híbridos. Como las porciones de los oligonucleótidos implicados en la formación de híbridos son sustancialmente diferentes de las porciones implicadas en la unión de la ARNasa H a ellos, se dispone de numerosas moléculas no codificantes que no activan la ARNasa H. Por ejemplo, dichas moléculas no codificantes pueden ser oligonucleótidos en los que al menos uno, o todos los restos de fosfato formadores de enlaces entre nucleótidos son fosfatos modificados, tales como metilfosfonatos, metilfosforotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforamidatos. Por ejemplo, uno de cada dos de los restos fosfato formadores de enlace entre nucleótidos puede modificarse como se ha descrito. En otro ejemplo no limitante, dichas moléculas no codificantes son moléculas en las que al menos uno, o todos los nucleótidos contienen un resto alquilo 2' inferior (p. ej., alquilo C1-C4, lineal o ramificado saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo 1-propenilo 2-propenilo e isopropilo). Por ejemplo, uno de cada dos de los nucleótidos formadores de enlace entre nucleótidos puede modificarse como se ha descrito.

Aunque los oligonucleótidos no codificantes son una forma preferida de moléculas no codificantes, la presente invención abarca otras moléculas no codificantes oligoméricas, incluyendo, pero no limitándose a miméticos de oligonucleótido tales como los que se describen más adelante.

Ejemplos específicos de compuestos no codificantes preferidos útiles en esta invención incluyen oligonucleótidos que contienen armazones modificados o ligamientos no naturales entre nucleósidos. Tal como se define en esta especificación, los oligonucleótidos que tienen armazones modificados incluyen los que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y los que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de esta especificación, y tal como se menciona a veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal entre nucleósidos también pueden considerarse para ser oligonucleósidos.

En otros miméticos de oligonucleótido preferidos, tanto el azúcar como el ligamiento entre nucleósidos, es decir, la cadena principal de las unidades de nucleótido, se sustituye por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto apropiado de ácido nucleico diana. A uno de dichos compuestos

oligoméricos, un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se hace referencia como un ácido peptidonucleico (APN). En los compuestos de APN, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por una cadena principal que contiene amida, en concreto, una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza del resto amida de la cadena principal.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de las nucleobases (a las que se suele hacer referencia en la técnica simplemente como "bases"). Ciertas nucleobases son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estos incluyen pirimidinas sustituidas en posición 5, 6 azapirimidinas y purinas sustituidas en las posiciones N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del híbrido de ácido nucleico hacia 0,6-1,2 °C y actualmente son las sustituciones de base preferidas, aun más concretamente cuando se combinan con modificaciones 2'-O-metoxietilo de azúcar.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica el ligamiento químico a uno o más restos del oligonucleótido o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen pero no se limitan a restos de lípidos tales como un resto de colesterol, de ácido cólico, un tioéter, p. ej., hexil-S-tritilitol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p. ej., restos de dodecandiol o undecilo, un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una cadena de poliamino o de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto de octadecilamino o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen de forma uniforme, y, de hecho, pueden incorporarse más de una de las modificaciones ya mencionadas en un único compuesto o incluso a un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos no codificantes que son compuestos quiméricos. Los compuestos no codificantes "quiméricos" o "quimeras" en el contexto de esta invención, son moléculas no codificantes, concretamente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, formadas cada una de al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica con el fin de conferir de esa forma la resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, captación celular aumentada, y una región adicional para la afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana.

Métodos de fabricación de moléculas no codificantes

Las moléculas no codificantes usadas de acuerdo con esta invención pueden elaborarse de forma conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Los equipos para dicha síntesis los venden varios vendedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Un método para sintetizar oligonucleótidos sobre un soporte sólido modificado se describe en la patente de EE.UU. N° 4.458.066.

Puede emplearse de forma adicional o alternativa cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. En una de dichas realizaciones automatizadas, se usan dietilfosforamiditos como materiales de partida y pueden sintetizarse como describen Beaucage, y col., (1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862.

Las moléculas no codificantes de la invención se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones no codificantes de origen biológico, o construcciones de vectores genéticos diseñadas para dirigir la síntesis *in vivo* de moléculas no codificantes. Las moléculas de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otra forma con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, formulaciones de liposomas, de moléculas dirigidas hacia receptores, orales, rectales, tópicas u otras, para colaborar en la captación, distribución y/o absorción.

Agentes terapéuticos

La presente invención también puede usarse como profiláctica o terapéutica, lo cual puede utilizarse con fines de tratamiento de una enfermedad genética.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona moléculas no codificantes que se unen a una diana seleccionada en el ARN premensajero de distrofina para inducir la omisión exónica eficaz y sistemática descrita en el presente documento en una cantidad terapéuticamente eficaz mezclada con un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o u otra de tipo adverso semejante, tal como molestia gástrica y similar, cuando se administra a un paciente. El término "vehículo" se refiere a un diluyente,

adyuvante, excipiente., o vehículo con el cual se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones de agua o salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferentemente como vehículos, concretamente para solución inyectable. En Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990) se describen vehículos farmacéuticos adecuados.

En una forma más específica de la invención hay composiciones farmacéuticas proporcionadas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de una molécula no codificante junto con diluyentes, conservantes, solubilizadores, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen diluyentes con diverso contenido de tampones (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, y aditivos tales como detergentes y agentes solubilizadores (p. ej., Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito sódico, conservantes (p. ej., tiomerosal, alcohol bencílico) y sustancias espesantes (p. ej., lactosa, manitol). El material puede incorporarse dentro de preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o dentro de liposomas. También puede usarse ácido hialurónico. Dichas composiciones pueden influir sobre el estado físico, la estabilidad, el índice de liberación *in vivo*, y el índice de eliminación *in vivo* de las proteínas y derivados presentes. Véase, p. ej., Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712. Las composiciones líquidas pueden prepararse en forma líquida, o pueden estar en polvo deshidratado, tal como en forma liofilizada.

Se apreciará que las composiciones farmacéuticas proporcionadas de acuerdo con la presente invención puedan administrarse mediante cualquiera de los medios conocidos en la técnica. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas para su administración se administran mediante inyección, por vía oral, o mediante vía pulmonar o nasal. Las moléculas no codificantes se suministran más preferentemente mediante las vías de administración intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, intramuscular, o subcutánea.

Terapia basada en molécula no codificante

La presente invención también aborda el uso de las moléculas no codificantes de la presente invención, para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad genética.

El suministro de una cantidad terapéuticamente útil de moléculas no codificantes puede lograrse mediante métodos publicados previamente. Por ejemplo, el suministro intracelular de la molécula no codificante puede ser a través de una composición que comprende una mezcla de la molécula no codificante y una cantidad eficaz de un copolímero en bloque. Un ejemplo de este método se describe en la solicitud de patente de EE.UU. US 20040248833.

Otros métodos de suministro de moléculas no codificantes en el núcleo se describen en Mann CJ y col., (2001) ["Antisense-induced exon skipping and the synthesis of dystrophin in the mdx mouse". Proc., Natl. Acad. Science, 98(1) 42-47] y en GebSKI y col., (2003). Human Molecular Genetics, 12(15): 1801-1811.

En la patente de EE.UU. US 6.806.084 se describe un método para introducir una molécula de ácido nucleico dentro de una célula por medio de un vector de expresión, bien como ADN desnudo, o bien en complejo con vehículos lipídicos.

Puede ser deseable suministrar la molécula no codificante en un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas a base de lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas o formulaciones de liposomas.

Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de suministro *in vitro* e *in vivo*. Estas formulaciones pueden tener características de carga neta catiónica, aniónica o neutra y son características útiles con los métodos de suministro *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Se ha demostrado que las vesículas unilaminares grandes (VUG), cuyo tamaño oscila desde 0,2-4,0 µm pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que contiene macromoléculas grandes. El ARN y el ADN pueden encapsularse dentro del interior acuoso y suministrarse a las células en una forma biológicamente activa (FraleY, y col., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981).

Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia génica eficaz, deberían estar presentes las características siguientes: (1) encapsulación de la molécula no codificante de interés con una alta eficacia, al tiempo que no se compromete su actividad biológica. (2) unión a una célula diana preferente y sustancial en comparación con células no diana; (3) suministro del contenido acuoso de la vesícula al citoplasma de la célula diana con una alta eficacia; y (4) expresión precisa y eficaz de la información genética (Mannino, y col., Biotechniques, 6:682, 1988).

La composición del liposoma suele ser una combinación de fosfolípidos, concretamente fosfolípidos de alta temperatura de transición de fase, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También

pueden usarse otros fosfolípido u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica, y la presencia de cationes divalentes.

De forma alternativa, la construcción no codificante puede combinarse con otros vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables para producir una composición farmacéutica. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo tampón fosfato salino. La composición puede formularse para la administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica.

Las vías de administración descritas se planean solo como guía, puesto que un facultativo experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración óptima y cualquier dosificación para cualquier animal y afección particular. Se han intentado múltiples abordajes para introducir nuevo material genético funcional dentro de las células, tanto *in vitro* como *in vivo* (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280).

Estos abordajes incluyen la integración del gen que se va a expresar en retrovirus modificados (Friedmann (1989) citado anteriormente; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), supl.: 5074S-5079S); la integración en vectores no retrovirales (Rosenfeld, y col. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld, y col. (1991) Science, 252:431-434); o el suministro de un transgén ligado a un elemento promotor potenciador heterólogo mediante liposomas (Friedmann (1989), citado anteriormente; Brigham, y col. (1989) Am. J. Med. Sci. 298:278-281; Nabel, y col. (1990) Science, 249:1285-1288; Hazinski, y col. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; Wang y Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855); acoplado a sistemas de transporte específicos de ligando a base de cationes (Wu y Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) el uso de vectores de expresión de ADN desnudo (Nabel y col. (1990), citado anteriormente); Wolff y col. (1990) Science, 247:1465-1468). La inyección directa de transgenes en el tejido produce únicamente expresión localizada (Rosenfeld (1992) citado anteriormente); Rosenfeld y col. (1991) citado anteriormente; Brigham y col. (1989) citado anteriormente; Nabel (1990) citado anteriormente; y Hazinski y col. (1991) citado anteriormente). El grupo de Brigham y col. (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 y Clinical Research (1991) 39 (resumen)) han publicado la transfección *in vivo* únicamente de pulmones de ratón después de la administración, bien intravenosa o bien intratraqueal de un complejo de ADN y liposoma. Un ejemplo de un artículo de revisión de procedimientos de terapia génica humana es: Anderson, Science (1992) 256:808-813.

Las moléculas no codificantes de la invención comprenden cualquier sal, ésteres, o sales de dichos ésteres, farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal incluyendo un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la divulgación está también concebida para profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, a sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y a otros bioequivalentes.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto original y no confieren efectos toxicológicos indeseables a éste.

Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido maleico, ácido ascórbico, ácido benzóico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglútamico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo, y yodo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una serie de formas dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y de la zona que se va a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y en membranas mucosas, incluyendo el suministro rectal), pulmonar, p. ej., mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, (incluyendo mediante nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intrarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o la administración intracraneal, p. ej., intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para la administración oral.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los ingredientes activos con el/los vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntima los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, en caso necesario, dando forma al producto.

Kits de la invención

La invención proporciona también *kits* para el tratamiento de un paciente con una enfermedad genética, *kit* que comprende al menos una molécula no codificante, envasada en un recipiente adecuado, junto con instrucciones para su uso.

En una realización preferida, los *kits* contendrán al menos una molécula no codificante tal como se define en las reivindicaciones. Los *kits* pueden contener también reactivos periféricos tales como tampones, estabilizantes, etc.

Los expertos en la técnica deben apreciar que las aplicaciones del método anterior tienen una amplia aplicación para la identificación de moléculas no codificantes adecuadas para su uso en el tratamiento de muchas otras enfermedades.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para describir de forma más completa la manera de usar la invención descrita anteriormente, así como para exponer los mejores modos previstos para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos no sirven en modo alguno para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino que se presentan más bien con fines ilustrativos.

Los métodos de clonación molecular, inmunología y química de proteínas que no se describen de forma explícita en los siguientes ejemplos, están publicados en la bibliografía y son conocidos por los expertos en la técnica. Los textos generales que describieron técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica incluyeron, por ejemplo: Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); Glover ed., *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II, MRL Press, Ltd., Oxford, R.U. (1985); y Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates/Wiley Intersciences, New York (2002).

Determinación de la omisión exónica inducida en células musculares humanas

Los intentos de los inventores de desarrollar un planteamiento racional en el diseño de moléculas no codificantes no tuvieron un éxito completo, ya que no parecía haber una tendencia sistemática que pudiera aplicarse a todos los exones. Como tal, la identificación de los compuestos de moléculas no codificantes más eficaces, y por tanto más terapéuticos, ha sido el resultado de estudios empíricos.

Estos estudios empíricos implicaron el uso de programas informáticos para identificar motivos potencialmente implicados en el proceso de corte y empalme. Se usaron también otros programas informáticos para identificar regiones del ARN premensajero que podrían no haber tenido una estructura secundaria extensa y, por tanto, eran sitios potenciales de apareamiento de moléculas no codificantes. No se probó que ninguno de estos planteamientos fuese completamente fiable en el diseño de oligonucleótidos no codificantes para la inducción fiable y eficaz de omisión exónica.

Se seleccionaron para su examen sitios de apareamiento del ARN premensajero de la distrofina humana, sobre la base inicial de los motivos o regiones conocidos o predichos implicados en el corte y empalme. Se diseñaron oligonucleótidos no codificantes 2-O-Me para ser complementarios a las secuencias diana en investigación, y se sintetizaron en un sintetizador de ácidos nucleicos Expedite 8909. Tras la finalización de la síntesis, los oligonucleótidos se escindieron de la columna de soporte y se desprotegeron en hidróxido de amonio antes de desalarse. La calidad de la síntesis de oligonucleótidos se controló mediante la intensidad de las señales de tritilo después de cada etapa de desprotección durante la síntesis, detectada en el registro de síntesis. La concentración de oligonucleótido no codificante se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm de una alícuota diluida.

Se ensayó entonces la capacidad de cantidades especificadas de moléculas no codificantes para inducir omisión exónica en un ensayo *in vitro*, tal como se describe a continuación.

Brevemente, se prepararon cultivos primarios de mioblastos normales a partir de biopsias de músculo humano obtenidas tras consentimiento informado. Las células se propagaron y se les permitió diferenciarse en miotubos usando técnicas de cultivo convencionales. Las células se transfectaron después con los oligonucleótidos no codificantes mediante el suministro de los oligonucleótidos a las células en forma de lipoplejos catiónicos, mezclas de moléculas no codificantes o preparaciones liposómicas catiónicas.

Después, las células se dejaron crecer durante otras 24 horas, tras lo cual se extrajo el ARN total y se comenzó el análisis molecular. Se llevó a cabo una amplificación con transcriptasa inversa (RT-PCR) para estudiar las regiones diana del ARN premensajero de la distrofina o los reordenamientos exónicos inducidos.

Por ejemplo, en el ensayo de la inducción de omisión del exón 19 por una molécula, la RT-PCR examinó varios exones para detectar la implicación de cualquiera de los exones adyacentes. Por ejemplo, al inducir la omisión del

exón 19, la RT-PCR se llevó a cabo con cebadores que amplificaban a lo largo de los exones 17 y 21. También se llevaron a cabo amplificaciones de productos aún más largos en esta zona (es decir, los exones 13-26) para asegurar que hubiera un sesgo de amplificación mínimo para el transcrito omitido inducido más corto. Los productos más cortos o de exón omitido tienden a amplificarse de forma más eficaz y pueden sesgar la estimación del transcrito normal e inducido.

Los tamaños de los productos de la reacción de amplificación se estimaron en un gel de agarosa y se compararon frente a patrones de tamaño apropiados. La confirmación final de la identidad de estos productos se llevó a cabo mediante secuenciación directa del ADN para establecer que se habían mantenido las conexiones de exón correctas o esperadas.

Una vez se ha inducido la omisión exónica eficaz con una molécula no codificante, las moléculas no codificantes solapantes posteriores pueden sintetizarse y evaluarse después en el ensayo como se ha descrito anteriormente. Nuestra definición de una molécula no codificante eficaz es una que induce omisión exónica fuerte y mantenida a concentraciones de transfección en el orden de 300 nM o menos.

Oligonucleótidos no codificantes dirigidos al exón 50

Se prepararon oligonucleótidos no codificantes dirigidos hacia el exón 50 y se ensayó su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

La molécula oligonucleotídica antisentido H50(+02+30) [SEQ ID NO: 173] fue un fuerte inductor de omisión exónica. Además, H50A(+07+33) [SEQ ID NO: 174] y H50D(+07-18) [SEQ ID NO: 175] indujeron ambos omisión exónica 50 cuando se suministraron a células a una concentración de 100 nM.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The University of Western Australia

<120> Oligonucleótidos no codificantes para la inducción de omisión exónica y método de uso de los mismos

<130> AHB/FP6820146

<140> EP12162995.0

<141> 28-06-2005

<150> EP10004274.6

<151> 28-06-2005

<150> PCT/AU2005/000943

<151> 28-06-2005

<160> 212

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 24

<212> ARN

<213> Humano

<400> 1

gauagguggu aucaacaucu guaa 24

<210> 2

<211> 21

<212> ARN

<213> Humano

<400> 2

gauagguggu aucaacaucu g 21

<210> 3

<211> 25

<212> ARN

<213> Humano

ES 2 627 917 T3

	<400> 3 gauagguggu aucaacau cu gaaag	25
5	<210> 4 <211> 20 <212> ARN <213> Humano	
10	<400> 4 ggugguauca acaucuguaa	20
15	<210> 5 <211> 20 <212> ARN <213> Humano	
20	<400> 5 guaucaacau cuguaagcac	20
25	<210> 6 <211> 23 <212> ARN <213> Humano	
30	<400> 6 ugcauguucc agucguugug ugg	23
35	<210> 7 <211> 25 <212> ARN <213> Humano	
40	<400> 7 cacuauucca gucaaaugug ucugg	25
45	<210> 8 <211> 25 <212> ARN <213> Humano	
50	<400> 8 auuuaccaac cuucaggauc gagua	25
55	<210> 9 <211> 21 <212> ARN <213> Humano	
60	<400> 9 ggccuaaaac acauacacau a	21
	<210> 10 <211> 20 <212> ARN <213> Canino	
	<400> 10 cauuuuugac cuacaugugg	20

ES 2 627 917 T3

	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Canino	
5	<400> 11	
	uuugaccuac auguggaaag	20
	<210> 12	
10	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> Canino	
	<400> 12	
15	uacauuuuug accuacaugu ggaaag	26
	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> ARN	
20	<213> Canino	
	<400> 13	
	auuuuugacc uacauugggaa ag	22
25	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Canino	
	<400> 14	
30	uacgaguuga uuugcggacc cag	23
	<210> 15	
	<211> 25	
35	<212> ARN	
	<213> Canino	
	<400> 15	
40	guggucuccu uaccuaugac ugugg	25
	<210> 16	
	<211> 17	
	<212> ARN	
45	<213> Canino	
	<400> 16	
	ggucuccuua ccuauga	17
50	<210> 17	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 17	
55	ugucucagua aucuucuac cuau	24
	<210> 18	
	<211> 24	
	<212> ARN	
60	<213> Humano	
	<400> 18	
	ucuuaccuau gacuauggau gaga	24

ES 2 627 917 T3

	<210> 19		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 19		
	gcaugaacuc uuguggaucc	20	
	<210> 20		
10	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 20		
15	ccagguacu acuuacauua	20	
	<210> 21		
	<211> 21		
	<212> ARN		
20	<213> Humano		
	<400> 21		
	aucguguguc acagcaucca g	21	
25	<210> 22		
	<211> 30		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 22		
30	uguucagggc augaacucuu guggauccuu		30
	<210> 23		
	<211> 31		
35	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 23		
40	uaggaggcgc cucccauccu guaggucacu g		31
	<210> 24		
	<211> 31		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
45	<400> 24		
	aggucuagga ggcgccuccc auccuguagg u		31
	<210> 25		
50	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 25		
55	gcgccuccca uccuguaggu cacug		25
	<210> 26		
	<211> 26		
	<212> ARN		
60	<213> Humano		
	<400> 26		
	cuucgaggag gucuaggagg cgccuc		26

ES 2 627 917 T3

	<210> 27		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 27		
	cucccauccu guaggucacu g	21	
	<210> 28		
10	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 28		
15	uaccaguuuu ugcccuguca gg	22	
	<210> 29		
	<211> 26		
	<212> ARN		
20	<213> Humano		
	<400> 29		
	ucaauaugcu gcuucccaaa cugaaa	26	
25	<210> 30		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 30		
30	cuaggaggcg ccucccaucc uguag	25	
	<210> 31		
	<211> 31		
35	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 31		
40	uuauuuuuu caucuacgau gucaguacuu c	31	
	<210> 32		
	<211> 31		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
45	<400> 32		
	cuuaccugcc aguggaggau uauauuccaa a	31	
	<210> 33		
50	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 33		
55	caucaggauu cuuaccugcc agugg	25	
	<210> 34		
	<211> 25		
	<212> ARN		
60	<213> Humano		
	<400> 34		
	cgaugucagu acuuccaaua uucac	25	

ES 2 627 917 T3

	<210> 35		
	<211> 18		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 35		
	accauucauc aggauucu	18	
	<210> 36		
10	<211> 18		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 36		
15	accugccagu ggaggauu	18	
	<210> 37		
	<211> 27		
	<212> ARN		
20	<213> Humano		
	<400> 37		
	ccaauuuca cuaaaaucaac cuguuaa	27	
25	<210> 38		
	<211> 30		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
30	<400> 38		
	caggauucu accugccagu ggaggauuau	30	
	<210> 39		
35	<211> 31		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 39		
40	acgaugucag uacuuccaau auucacuaaa u	31	
	<210> 40		
	<211> 31		
	<212> ARN		
45	<213> Humano		
	<400> 40		
	auuuccaucu acgaugucag uacuuccaau a	31	
50	<210> 41		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
55	<400> 41		
	caggagcuuc caaauugcugc a	21	
	<210> 42		
	<211> 29		
60	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 42		
65	cuugucuuca ggagcuucca aaugcugca	29	

ES 2 627 917 T3

	<210> 43		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 43		
	uccucagcag aaagaagcca cg		22
	<210> 44		
10	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 44		
15	uuagaaaucu cuccuugugc		20
	<210> 45		
	<211> 20		
	<212> ARN		
20	<213> Humano		
	<400> 45		
	uaaaauugggu guuacacaau		20
25	<210> 46		
	<211> 24		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 46		
30	cccugaggca uucccaucuu gaau		24
	<210> 47		
	<211> 20		
35	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 47		
40	aggacuuacu ugcuuuuuu		20
	<210> 48		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
45	<400> 48		
	cuugaauua ggagaucau cug		23
	<210> 49		
50	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 49		
55	caucuucuga uaauuuuccu guu		23
	<210> 50		
	<211> 24		
	<212> ARN		
60	<213> Humano		
	<400> 50		
	ucuucuguuu uuguuagcca guca		24

ES 2 627 917 T3

	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 51	
	ucuauguaaa cugaaaauuu	20
	<210> 52	
10	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 52	
15	uucuggagau ccauuaaaac	20
	<210> 53	
	<211> 24	
	<212> ARN	
20	<213> Humano	
	<400> 53	
	cagcaguugc gugaucucca cuag	24
25	<210> 54	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 54	
30	uucaucaacu accaccacca u	21
	<210> 55	
	<211> 25	
35	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 55	
	cuaagcaaaa uaaucugacc uaaag	25
40	<210> 56	
	<211> 28	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 56	
	cuuguaaaag aaccagcgg ucuucugu	28
	<210> 57	
50	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 57	
55	caucuacaga uguuugccca uc	22
	<210> 58	
	<211> 23	
	<212> ARN	
60	<213> Humano	
	<400> 58	
	gaaggauguc uuguaaaaga acc	23

ES 2 627 917 T3

	<210> 59		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 59		
	accuguucuu caguaagacg	20	
10	<210> 60		
	<211> 24		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
15	<400> 60		
	caugacacac cuguucuuca guaa	24	
20	<210> 61		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
25	<400> 61		
	cauuugagaa ggaugucuug	20	
30	<210> 62		
	<211> 24		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
35	<400> 62		
	aucucccaau accuggagaa gaga	24	
40	<210> 63		
	<211> 31		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
45	<400> 63		
	gccaugcacu aaaaaggcac ugcaagacau u	31	
50	<210> 64		
	<211> 24		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
55	<400> 64		
	ucuuuaaagc caguugugug aauc	24	
60	<210> 65		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
65	<400> 65		
	uuucugaaag ccaugcacua a	21	
	<210> 66		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 66		
	guacauacgg ccaguuuuug aagac	25	

ES 2 627 917 T3

	<210> 75	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 75	
	gaucuuguuu gagugaauac agu	23
	<210> 76	
10	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 76	
15	guuauccagc caugcuuccg uc	22
	<210> 77	
	<211> 25	
	<212> ARN	
20	<213> Humano	
	<400> 77	
	ugauaauugg uaucacuaac cugug	25
25	<210> 78	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 78	
30	guaucacuaa ccugugcugu ac	22
	<210> 79	
	<211> 20	
35	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 79	
40	cagcaguagu ugucaucugc	20
	<210> 80	
	<211> 31	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 80	
	gccugagcug aucugcuggc aucuugcagu u	31
	<210> 81	
50	<211> 28	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 81	
55	cuggcagaau ucgauccacc ggcuguuc	28
	<210> 82	
	<211> 22	
	<212> ARN	
60	<213> Humano	
	<400> 82	
	cagcaguagu ugucaucugc uc	22

ES 2 627 917 T3

	<210> 83	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 83	
	ugauggggug guggguugg	19
	<210> 84	
10	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 84	
15	aucugcauua acaccucua gaaag	25
	<210> 85	
	<211> 24	
	<212> ARN	
20	<213> Humano	
	<400> 85	
	ccggcuguuc aguuguucug aggc	24
25	<210> 86	
	<211> 28	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 86	
30	aucugcauua acaccucua gaaagaaa	28
	<210> 87	
	<211> 28	
35	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 87	
40	gaaggagaag agauucuuac cuuacaaa	28
	<210> 88	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 88	
	auucgaucca ccggcuguuc	20
	<210> 89	
50	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 89	
55	cugcuggcau cuugcaguu	19
	<210> 90	
	<211> 22	
	<212> ARN	
60	<213> Humano	
	<400> 90	
	gccgguugac uucauccugu gc	22

ES 2 627 917 T3

	<210> 91	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 91	
	cugcauccag gaacaugggu cc	22
10	<210> 92	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
15	<400> 92	
	gucugcaucc aggaacaugg guc	23
20	<210> 93	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 93	
	guugaagauc ugauagccgg uuga	24
25	<210> 94	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
30	<400> 94	
	uacuuacugu cuguagcucu uucu	24
35	<210> 95	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 95	
	cacucauggu succugauag cgca	24
40	<210> 96	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 96	
	cugcaauucc ccgagucucu gc	22
50	<210> 97	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
55	<400> 97	
	acugcuggac ccauguccug aug	23
60	<210> 98	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 98	
	cuaaguugag guauggagag u	21

ES 2 627 917 T3

	<210> 99		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 99		
	uauucacaga ccugcaauuc ccc		23
	<210> 100		
10	<211> 26		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 100		
15	acaguggugc ugagauagua uaggcc		26
	<210> 101		
	<211> 22		
	<212> ARN		
20	<213> Humano		
	<400> 101		
	uaggccacuu uguugcucu gc		22
	<210> 102		
25	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 102		
30	uucagagggc gcuuucuuc	19	
	<210> 103		
	<211> 23		
	<212> ARN		
35	<213> Humano		
	<400> 103		
	gggcaggcca uuccucuuuc aga		23
40	<210> 104		
	<211> 24		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
45	<400> 104		
	ucuucagggg uuguauuguga uucu		24
	<210> 105		
50	<211> 27		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 105		
55	cugggcugaa uugucugaau aucacug		27
	<210> 106		
	<211> 26		
	<212> ARN		
60	<213> Humano		
	<400> 106		
	cuguuggcac augugauccc acugag		26

ES 2 627 917 T3

	<210> 107 <211> 24 <212> ARN <213> Humano	
5	<400> 107 gucua <u>u</u> accu guuggc <u>a</u> u guga	24
10	<210> 108 <211> 25 <212> ARN <213> Humano	
15	<400> 108 ug <u>c</u> uuuc <u>u</u> g uaa <u>u</u> cauc <u>u</u> g gag <u>u</u>	25
20	<210> 109 <211> 26 <212> ARN <213> Humano	
25	<400> 109 cc <u>u</u> cc <u>u</u> uu <u>u</u> cu gg <u>c</u> auag <u>a</u> cc u <u>u</u> cc <u>a</u> c	26
30	<210> 110 <211> 25 <212> ARN <213> Humano	
35	<400> 110 ug <u>u</u> g <u>u</u> ca <u>u</u> cc au <u>u</u> cg <u>u</u> g <u>c</u> au cu <u>c</u> u <u>g</u>	25
40	<210> 111 <211> 25 <212> ARN <213> Humano	
45	<400> 111 uu <u>a</u> agg <u>c</u> c <u>u</u> c u <u>u</u> g <u>u</u> g <u>c</u> u <u>a</u> c <u>a</u> gg <u>u</u> g <u>g</u>	25
50	<210> 112 <211> 23 <212> ARN <213> Humano	
55	<400> 112 ggg <u>c</u> c <u>u</u> c <u>u</u> uc uu <u>u</u> ag <u>c</u> u <u>c</u> u <u>c</u> u <u>g</u> a	23
60	<210> 113 <211> 22 <212> ARN <213> Humano	
65	<400> 113 g <u>a</u> cu <u>u</u> cc <u>a</u> aa g <u>u</u> cu <u>u</u> g <u>c</u> au <u>u</u> u <u>c</u>	22
70	<210> 114 <211> 24 <212> ARN <213> Humano	
75	<400> 114 g <u>c</u> ca <u>a</u> ca <u>u</u> g <u>c</u> c <u>c</u> aa <u>a</u> cu <u>u</u> cc u <u>a</u> ag	24

ES 2 627 917 T3

	<210> 115		
	<211> 26		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 115		
	cagagauuuc cucagcuccg ccagga	26	
	<210> 116		
10	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 116		
15	cuuacauca gcaccucaga g	21	
	<210> 117		
	<211> 25		
	<212> ARN		
20	<213> Humano		
	<400> 117		
	uccgccaucu guuagggucu gugcc	25	
25	<210> 118		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 118		
30	auuuggguua uccucugaau gucgc	25	
	<210> 119		
	<211> 22		
35	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 119		
40	cauaccucuu cauguaguuc uc	22	
	<210> 120		
	<211> 31		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
45	<400> 120		
	cauuugagcu gcguccaccu ugucgucugu g	31	
	<210> 121		
50	<211> 26		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 121		
55	uccugggcag acuggaugcu cuguuc	26	
	<210> 122		
	<211> 23		
	<212> ARN		
60	<213> Humano		
	<400> 122		
	uugccugggc uuccugaggc auu	23	

ES 2 627 917 T3

	<210> 123	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 123	
	uucugaaaua acauauaccu gugc	24
10	<210> 124	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
15	<400> 124	
	uaguuucuga aaauacauau accug	25
20	<210> 125	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 125	
	gacuugucaa aucagauugg a	21
25	<210> 126	
	<211> 24	
30	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 126	
	guuucugaaa uaacauauac cugu	24
35	<210> 127	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
40	<400> 127	
	caccagaaau acauaccaca	20
45	<210> 128	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 128	
	caaugauuuu gcugugacug	20
50	<210> 129	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
55	<400> 129	
	cgaaacuuca uggagacauc uug	23
60	<210> 130	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
65	<400> 130	
	cuuguagacg cugcucaaaa uuggc	25

ES 2 627 917 T3

	<210> 131	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 131	
	caugcacaca ccuuugcucc	20
	<210> 132	
10	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 132	
15	ucuguacaau cugacgucca gucu	24
	<210> 133	
	<211> 27	
	<212> ARN	
20	<213> Humano	
	<400> 133	
	gucuuuauca ccuuuuccac uucagac	27
25	<210> 134	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 134	
30	ccgucugcuu uuucuguaca aucug	25
	<210> 135	
	<211> 22	
35	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 135	
40	uccauaucug uagcugccag cc	22
	<210> 136	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 136	
	ccaggcaacu ucagaaucca aa	23
	<210> 137	
50	<211> 30	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 137	
55	uuucuguuac cugaaaagaa uuauaaugaa	30
	<210> 138	
	<211> 25	
	<212> ARN	
60	<213> Humano	
	<400> 138	
	cauucuuuc cuuucgcauc uuacg	25

ES 2 627 917 T3

	<210> 139	
	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 139	
	ugaucucuuu gucaauucca uaucug	26
	<210> 140	
10	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 140	
15	uucagugaua uagguuuuac cuuuccc	27
	<210> 141	
	<211> 26	
	<212> ARN	
20	<213> Humano	
	<400> 141	
	cuguagcugc cagccauucu gucaag	26
25	<210> 142	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
30	<400> 142	
	ucuucugcuc gggaggugac a	21
	<210> 143	
	<211> 20	
35	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 143	
40	ccaguuacua uucagaagac	20
	<210> 144	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 144	
	ucuucaggug caccuucugu	20
	<210> 145	
50	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 145	
55	ugugaugugg uccacauucu gguca	25
	<210> 146	
	<211> 20	
	<212> ARN	
60	<213> Humano	
	<400> 146	
	ccauguguuu cugguauucc	20

ES 2 627 917 T3

	<210> 147	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 147	
	cguguagagu ccaccuuugg gcgua	25
10	<210> 148	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
15	<400> 148	
	uacuaauuuc cugcaguggu cacc	24
20	<210> 149	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
25	<400> 149	
	uucuguguga aauggcugca aauc	24
30	<210> 150	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 150	
	ccuucaaagg aauggaggcc	20
35	<210> 151	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
40	<400> 151	
	ugcugaauuu cagccuccag ugguu	25
45	<210> 152	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 152	
	ugaagucuuc cucuuucaga uucac	25
50	<210> 153	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
55	<400> 153	
	cuggcuuucu cucaucugug auuc	24
60	<210> 154	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
65	<400> 154	
	guuguaaguu gucuccuuu	20

ES 2 627 917 T3

	<210> 155	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 155	
	uugucuguaa cagcugcugu	20
10	<210> 156	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
15	<400> 156	
	gcucuaauac cuugagagca	20
20	<210> 157	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 157	
	cuugagacc ucaaauccug uu	22
25	<210> 158	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
30	<400> 158	
	cuuuuuuuuc cuuucaucuc ugggc	25
35	<210> 159	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 159	
	aucguuuuu cacggacagu gugcugg	27
40	<210> 160	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 160	
	gggcuuguga gacaugagug auuu	24
50	<210> 161	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 161	
55	accuucagag gacuccuu gc	22
60	<210> 162	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 162	
	uauguguuac cuaccuugu cgguc	25

ES 2 627 917 T3

	<210> 163	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 163	
	ggagagagcu uccuguagcu	20
10	<210> 164	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
15	<400> 164	
	ucacccuuuc cacaggcguu gca	23
20	<210> 165	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 165	
	uuugugucuu ucugagaaac	20
25	<210> 166	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
30	<400> 166	
	aaagacuuac cuuaagauac	20
35	<210> 167	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 167	
	aucugucaaa ucgccugcag	20
40	<210> 168	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 168	
	uuaccuugac uugcucaagc	20
50	<210> 169	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 169	
	uccagguuca agugggauac	20
60	<210> 170	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 170	
	gcucuucugg gcuauggga gcacu	25
65		

ES 2 627 917 T3

	<210> 171		
	<211> 27		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 171		
	accuuuaucc acuggagauu ugucugc		27
	<210> 172		
10	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 172		
15	uuccaccagu aacugaaaca g		21
	<210> 173		
	<211> 29		
	<212> ARN		
20	<213> Humano		
	<400> 173		
	ccacucagag cucagaucuu cuaacuucc		29
	<210> 174		
25	<211> 27		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 174		
30	cuucaacuca gagcucagau cuucuaa		27
	<210> 175		
	<211> 25		
35	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 175		
	gggauccagu auacuuacag gcucc		25
40	<210> 176		
	<211> 26		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
45	<400> 176		
	accagaguaa cagucugagu aggagc		26
	<210> 177		
50	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 177		
55	cucauaccuu cugcuugaug auc		23
	<210> 178		
	<211> 24		
	<212> ARN		
60	<213> Humano		
	<400> 178		
	uucuguccaa gcccgguuga aauc		24

ES 2 627 917 T3

	<210> 179	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 179	
	acaucaagga ggauggcauu ucuag	25
	<210> 180	
10	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 180	
15	acaucaagga agauggcauu ucuag	25
	<210> 181	
	<211> 30	
	<212> ARN	
20	<213> Humano	
	<400> 181	
	cuccaacauc aaggaagaug gcuuucuag	30
25	<210> 182	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
30	<400> 182	
	aucauuuuuu cucuaccuu cugcu	25
	<210> 183	
	<211> 36	
35	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 183	
40	aucauuuuuu cucuaccuu cugcuaggag cuaaaa	36
	<210> 184	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 184	
	caccaccau caccucugu g	21
	<210> 185	
50	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 185	
55	aucaucucgu ugauauccuc aa	22
	<210> 186	
	<211> 21	
	<212> ARN	
60	<213> Humano	
	<400> 186	
	uccugcauug uugcciguaa g	21

ES 2 627 917 T3

	<210> 187		
	<211> 30		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 187		
	uccaacuggg gacgccucug uuccaaaucc		30
	<210> 188		
10	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 188		
15	acuggggacg ccucuguucc a	21	
	<210> 189		
	<211> 20		
	<212> ARN		
20	<213> Humano		
	<400> 189		
	ccguaaugau uguucuagcc	20	
25	<210> 190		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 190		
30	uguuaaaaaa cuuacuucga	20	
	<210> 191		
	<211> 31		
35	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 191		
40	cauUCAACUG uugccuccgg uucugaaggu g		31
	<210> 192		
	<211> 24		
	<212> ARN		
45	<213> Humano		
	<400> 192		
	cuguugccuc cgguucugaa ggug	24	
50	<210> 193		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 193		
55	cauUCAACUG uugccuccgg uucug	25	
	<210> 194		
	<211> 21		
60	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 194		
65	uacuaaccuu gguuucugug a	21	

ES 2 627 917 T3

	<210> 195	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
5	<400> 195	
	cugaaggugu ucuuguacuu caucc	25
	<210> 196	
10	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 196	
15	uguauaggga cccuccuucc augacuc	27
	<210> 197	
	<211> 25	
	<212> ARN	
20	<213> Humano	
	<400> 197	
	cuaaccuugg uuucugugau uuucu	25
25	<210> 198	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 198	
30	gguaucuuug auacuaaccu ugguuuc	27
	<210> 199	
	<211> 22	
35	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 199	
	auucuuuca cuagaauaaa ag	22
40	<210> 200	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
45	<400> 200	
	gauucugaau ucuuucacu agaau	25
	<210> 201	
50	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Humano	
	<400> 201	
55	auccacuga uucugaauuc	20
	<210> 202	
	<211> 22	
	<212> ARN	
60	<213> Humano	
	<400> 202	
	uuggcucugg ccuguccuaa ga	22

ES 2 627 917 T3

	<210> 203		
	<211> 29		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
5	<400> 203		
	cucuuuuccag guucaagugg gauacuagc		30
	<210> 204		
10	<211> 31		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 204		
15	caagcuuuuc uuuuaguugc ugcucuuuuc c		31
	<210> 205		
	<211> 30		
	<212> ARN		
20	<213> Humano		
	<400> 205		
	uaauuuuuug uucuucuagc cuggagaaag		30
25	<210> 206		
	<211> 28		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 206		
30	cugcuuccuc caaccuuuuu acauuuuc		28
	<210> 207		
	<211> 26		
35	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 207		
40	ccaauugccau ccuggaguuc cuguuaa		26
	<210> 208		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
45	<400> 208		
	uccuguagaa uacuggcauc		20
	<210> 209		
50	<211> 27		
	<212> ARN		
	<213> Humano		
	<400> 209		
55	ugcagaccuc cugccaccgc agauuca		27
	<210> 210		
	<211> 20		
	<212> ARN		
60	<213> Humano		
	<400> 210		
	cuaccuuuu uuucugucug		20

ES 2 627 917 T3

<210> 211
<211> 20
<212> ARN
<213> Humano

5

<400> 211
uguuuuugag gauugcugaa 20

10

<210> 212
<211> 84
<212> ARN
<213> Humano

15

<400> 212
cagcaguagu ugucaucugc ucaacuggca gaauucgauc caccggcugu ucaagccuga 60
gcugaucugc ucgcaucuug cagu 84

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido no codificante aislado que se une al ARN premensajero de la distrofina humana en el que dicho oligonucleótido tiene de 17 a 30 nucleótidos de longitud y es hibridable de forma específica con una región diana del exón 50 del gen de distrofina, designada como sitio de apareamiento H50D (+07-18), en el que dicho oligonucleótido no codificante es un oligonucleótido morfolino no codificante, y, en el que dicho oligonucleótido induce la omisión del exón 50.
- 10 2. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1 expuesto como SEQ ID NO: 175, opcionalmente en el que las bases de uracilo (U) son bases de timina (T).
- 15 3. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende 17 bases de SEQ ID NO: 175, opcionalmente en el que las bases de uracilo (U) son bases de timina (T).
- 20 4. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, que es de aproximadamente 25 nucleótidos de longitud.
- 25 5. El oligonucleótido no codificante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el oligonucleótido está ligado químicamente a uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular, o la captación celular del oligonucleótido no codificante.
- 30 6. El oligonucleótido no codificante de la reivindicación 5, en la que el oligonucleótido está ligado químicamente a una molécula de polietilenglicol.
7. Una composición, que comprende un oligonucleótido no codificante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y una solución salina que incluye un tampón fosfato.
8. El oligonucleótido no codificante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición de la reivindicación 7, para su uso en un método de tratamiento de la distrofia muscular.
9. El oligonucleótido o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la distrofia muscular es la distrofia muscular de Duchenne.

FIGURA 1.

pb	Aceptor	ESE	Donante
uc <u>a</u> ugcacugagugagaccucucucucgagG	CGCUAGGC	UGGAG	CA////CCGUGCAGACUGA
			CGgucucu <u>u</u>

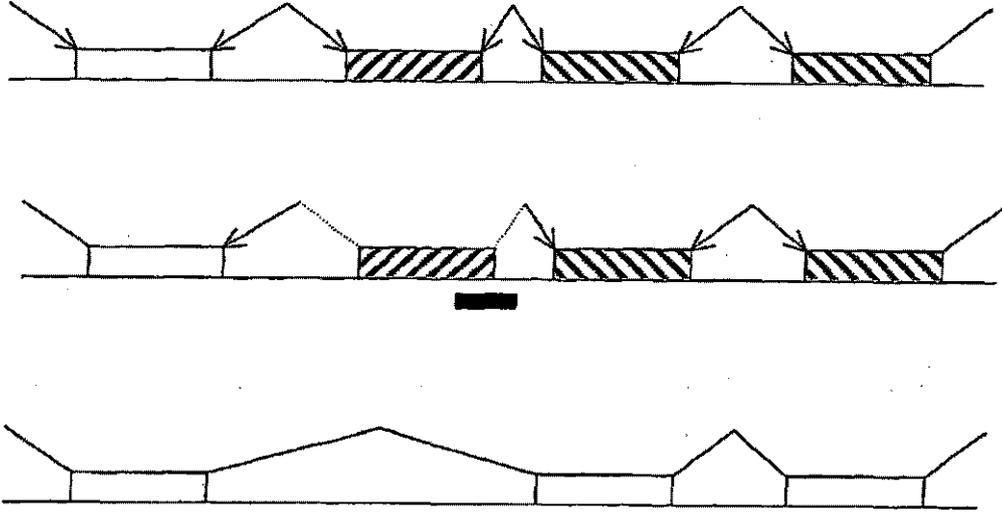


FIGURA 2