

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 460**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016 PCT/EP2016/063404**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16198676**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016 E 16734566 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3307891**

54 Título: **Terapia combinada para la distrofia muscular de Duchenne**

30 Prioridad:

10.06.2015 EP 15305890

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2020

73 Titular/es:

**ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE (25.0%)
47, boulevard de l'Hôpital
75013 Paris, FR;
SORBONNE UNIVERSITÉ (25.0%);
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**LORAIN, STÉPHANIE;
VOIT, THOMAS;
WOOD, MATTHEW y
MCCLOREY, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 764 460 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

Terapia combinada para la distrofia muscular de Duchenne

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso combinado de oligonucleótidos antisentido y vectores virales para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

Antecedentes de la invención

10 Las distrofinopatías son patologías causadas por anomalías en el gen *DMD* que codifica una proteína subsarcolémica llamada distrofina. Con respecto a las deleciones grandes, la alteración genética más frecuente, la gravedad del fenotipo está condicionada fundamentalmente por el impacto de la mutación en el marco de lectura de la proteína del transcrito distrofina. La distrofina está ausente en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) debido a mutaciones que alteran el marco de lectura abierto. En una forma más leve de la enfermedad, la distrofia muscular de Becker, las mutaciones crean transcritos acortados, pero en marco que codifican una distrofina parcialmente funcional. La estructura de la distrofina (dominio de barra central constituido por 24 repeticiones tipo espectrina) tolera deleciones internas grandes (1) que condujeron al desarrollo de dos estrategias terapéuticas principales: terapia génica clásica con transferencia de cDNAs de micro-distrofina funcional en los músculos, y salto de exones direccionado. Ambas estrategias han presentado resultados estimulantes utilizando vectores virales adeno-asociados (AAV), que permiten la transferencia eficiente de genes a los músculos. La estrategia de salto de exones convierte una mutación fuera de marco en una mutación en marco que conduce a una distrofina delecionada internamente pero parcialmente funcional. Esta estrategia terapéutica ha demostrado cierto éxito utilizando oligonucleótidos antisentido (AONs), particularmente en estudios clínicos recientes (2-5). Los AONs tienen la enorme ventaja de no ser inmunógenos, pero presentan la desventaja de tener que ser inyectados regularmente para mantener el beneficio terapéutico. Los autores de la presente invención y otros han demostrado que, alternativamente, las secuencias antisentido podrían introducirse en los músculos esqueléticos o cardíacos utilizando un pequeño RNA nuclear tal como U7snRNA o U1snRNA (6-8). Estas moléculas terapéuticas están vectorizadas en partículas AAV que aseguran una producción permanente de los agentes terapéuticos antisentido en modelos murinos deficientes en distrofina (7-9), así como en el perro GRMD deficiente en distrofina (10; 11). Un tratamiento una sola vez de AAV-U7 es suficiente para alcanzar niveles sustanciales de cuasi-distrofina restaurada, lo cual está asociado con una mejora importante de la fuerza muscular.

15 El destino del genoma de AAV en los músculos distróficos es importante considerando la inmunogenicidad de la cápsida viral que prohíbe hoy en día los tratamientos recurrentes (12). Dado que las distrofias musculares se caracterizan por ciclos repetidos de necrosis-regeneración y puesto que los vectores AAV exhiben un genoma episómico no integrador, los autores de la invención formularon la hipótesis de que AAV-U7 podría perderse durante la necrosis de las miofibras distróficas. De hecho, los presentes inventores siguieron genomas virales terapéuticos durante la terapia de salto de exones mediada por AAV-U7 en ratones dKO afectados de distrofia grave y en perros GRMD después de la restauración óptimo de distrofina y demostraron que la restauración de la distrofina disminuía significativamente al cabo de un año en diversos músculos esqueléticos, lo cual estaba correlacionado con una pérdida importante del genoma viral (13; 11). Maeva Le Hir (39) describe una persistencia mejor de los genomas terapéuticos AAV U7snRNAex23 que de los genomas no terapéuticos en los músculos, y llega a la conclusión de que la restauración de distrofina es necesaria para el mantenimiento del genoma de AAV, pero la pérdida subsiguiente del genoma de AAV requiere readministración del vector, lo cual no es posible debido a la reacción inmune para AAV.

20 40 Willem M. H. Hoogaars et al (40) describe efectos beneficiosos debido al tratamiento combinado de AAV-U7snRNAex23 con el receptor soluble de activina tipo IIB en ratones mdx.

45 Es importante que los autores de la presente invención demostraron que los músculos mdx moderadamente distróficos pierden genomas virales no terapéuticos rápidamente después de la inyección y que esta pérdida se lentifica acusadamente cuando dosis altas de genomas virales restauran rápidamente la distrofina en el sarcolema (13). Es también importante que no se observa pérdida rápida similar alguna de los genomas de AAV de la musculatura de control normal. Por esta razón, los autores de la invención propusieron previamente, a fin de lograr la restauración de larga duración de la expresión de distrofina, un tratamiento de dos pasos que consistía en primer lugar en una sola inyección sistémica de vector de AAV-U7 para inducir una expresión fuerte y generalizada de distrofina en los músculos, y en segundo lugar, inyecciones sistémicas recurrentes de oligonucleótidos antisentido para prevenir la reaparición progresiva de un fenotipo distrófico causada por la pérdida parcial de genomas de AAV a lo largo del tiempo (13). Sin embargo, son necesarios todavía métodos mejorados para la restauración de larga duración de la expresión de distrofina.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un oligonucleótido antisentido (AON) aislado capaz de inducir un salto de exones en un pre-mRNA de distrofina, para uso en el tratamiento de una distrofia muscular en combinación con un vector viral que codifica un producto terapéutico de la distrofia muscular, el cual puede ser, por ejemplo, o bien (i) un oligonucleótido antisentido capaz de inducir un salto de exones en un pre-mRNA de distrofina o (ii) un vector viral que codifica una proteína distrofina funcional, en donde dicho tratamiento comprende administrar dicho oligonucleótido antes de la administración de dicho vector viral.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un AON aislado capaz de inducir un salto de exones en un pre-mRNA de distrofina, para uso en el tratamiento de una distrofia muscular, en donde dicho AON se administra como pretratamiento antes de la administración al paciente que se encuentra en necesidad de ello de un vector viral terapéutico, tal como un vector viral que codifica un oligonucleótido antisentido capaz de inducir un salto de exones en un pre-mRNA de distrofina, o un vector viral que lleva un gen funcional codificante de distrofina.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende (i) un AON aislado capaz de inducir un salto de exones en un pre-mRNA de distrofina y (ii) un vector viral que codifica un oligonucleótido antisentido capaz de inducir un salto de exones en un pre-mRNA de distrofina, o un vector viral que lleva un gen funcional codificante de distrofina. El kit de la presente invención es útil para implementar los métodos terapéuticos descritos en esta memoria.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores demuestran en esta memoria que una terapia combinada de dos pasos de una distrofia muscular es ventajosa sobre las estrategias de tratamiento conocidas en la técnica anterior. La invención se refiere a un oligonucleótido antisentido aislado como se ha descrito anteriormente, apropiado para inducir salto de exones en un pre-mRNA de distrofina e inducir las células musculares a producir un transcrito de mRNA que codifica una proteína distrofina funcional, para uso en un método para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, en donde dicho AON aislado asegura la integridad de la célula muscular antes de intentar una terapia de la distrofia muscular de Duchenne con un vector viral. La terapia de combinación propuesta en esta memoria comprende en primer lugar la administración de un AON aislado como se ha descrito anteriormente, apropiada para inducir salto de exones en un pre-mRNA de distrofina e inducir las células musculares a producir un transcrito de mRNA que codifica una proteína distrofina funcional. En un segundo paso, el método de la presente invención comprende administrar al mismo individuo al menos un vector viral que codifica un producto terapéutico de la distrofia muscular de Duchenne. El vector viral (o vector terapéutico viral) está diseñado para restaurar una función de distrofina en una célula muscular. Por ejemplo, el al menos un vector viral capaz de restaurar una función de distrofina en la célula muscular es un vector viral que o bien (i) codifica un oligonucleótido antisentido (al que se hace referencia también como un "virus codificante de AON" en la descripción que sigue) capaz de inducir salto de exones en un pre-mRNA de distrofina e inducir las células musculares a producir un transcrito de mRNA que codifica una proteína distrofina funcional, (ii) está diseñado para introducir en la célula muscular medios para corregir el gen de distrofina en el genoma de dicha célula muscular, tales como medios de edición del genoma que implementan uno o más endonucleasas específicas para el gen de distrofina, o (iii) codifica una proteína distrofina funcional.

Sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, se cree que el periodo de tiempo entre la inyección del virus codificante de AON y la expresión de una distrofina funcional (sea por la vía de salto de exones en un pre-mRNA endógeno de distrofina o por la vía de expresión de un gen de distrofina heterólogo) en cantidad suficiente en el sarcolema es crítico para el mantenimiento de los genomas terapéuticos virales en los músculos tratados. Por esta razón, se cree que un primer paso de inducción de la expresión temporal de distrofina funcional en el sarcolema de las miofibras con AONs aislados asegura la integridad de la membrana antes de la inyección de un vector terapéutico viral capaz de restaurar la función de distrofina en una célula muscular. Esto podría ser particularmente crítico para vectores de AAV recombinantes que presentan un genoma episómico no integrador, y que podrían perderse durante los ciclos repetidos de necrosis-regeneración, lo cual es una de las características de las miofibras distróficas.

Las expresiones "oligonucleótido antisentido" y "AON" se utilizan intercambiamente y se refieren a una secuencia de ácido nucleico monocatenario, p. ej. una secuencia de DNA o RNA, que es complementaria de una parte de un pre-mRNA que codifica la proteína distrofina y es por tanto capaz de formar, por apareamiento de bases Watson-Crick, un heterodúplex dentro de la secuencia diana. En particular, el AON de la presente invención está diseñado para bloquear un sitio aceptor de remodelación (SA) y/o un mejorador de remodelación de exones (ESE) y/o un punto de ramificación en el pre-mRNA de distrofina y/o un sitio donante de remodelación (SD) y/o cualquier secuencia que pudiera modular la remodelación del pre-mRNA, es decir que aquél está diseñado para ser complementario de una parte del pre-mRNA de distrofina que comprende un SA, un ESE, una secuencia de punto de ramificación, un SD, y/o cualquier secuencia que pudiera modular la remodelación del pre-mRNA (14, 15).

En una realización particular, la secuencia direccionada dentro del pre-mRNA de distrofina puede incluir un sitio de remodelación 3' o 5' de un pre-mRNA, o un punto de ramificación. La secuencia diana puede encontrarse dentro de

un exón o dentro de un intrón o superpuesta a una unión intrón-exón o exón-intrón. La secuencia diana para el sitio de remodelación puede incluir una secuencia de mRNA que tiene su extremo 5' 1 a aproximadamente 50 pares de bases aguas abajo de una unión normal aceptora de remodelación en un mRNA preprocesado. Una secuencia diana preferida para remodelación es cualquier región de un pre-mRNA que incluye un sitio de remodelación y/o está contenida enteramente dentro de una secuencia codificante de exón y/o abarca un sitio aceptor y/o donante de remodelación. Por supuesto, la secuencia diana puede incluir varias de estas secuencias que pueden modular la remodelación del-mRNA, y varias de tales secuencias diana pueden combinarse para lograr el efecto deseado.

Están disponibles herramientas para identificación de las secuencias SA, ESE, SD y de punto de ramificación en un pre-mRNA de interés. Como es bien conocido por los expertos en la técnica, SA son secuencias conservadas, se encuentran en el extremo 3' del intrón y terminan el intrón con una secuencia AG prácticamente invariable. SD son secuencias conservadas, se encuentran en el extremo 5' del intrón y comienzan el intrón con una secuencia GT prácticamente invariable. Adicionalmente, los motivos ESE pueden predecirse en la secuencia del exón que se desea saltar utilizando la herramienta de software ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>). El diseño del AON puede llevarse a cabo luego siguiendo las reglas publicadas en Aartsma-Rus et al. (16).

El AON de la invención está diseñado para complementar secuencias adecuadas dentro del pre-mRNA de distrofina que se requieren para la remodelación correcta del exón direccionado, bloqueando con ello las reacciones de remodelación que podrían incorporar el exón direccionado en el mRNA maduro.

Los genes de distrofina humana mutados expresan distrofina no medible en absoluto en los músculos de los pacientes de distrofia muscular de Duchenne de. Para remediar esta condición, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención se hibridan típicamente a regiones seleccionadas de un pre-mRNA de un gen de distrofina humana mutado, inducen salto de exones en el mRNA de distrofina, y hacen posible con ello que las células musculares produzcan un transcrito de mRNA que codifica una proteína distrofina funcional. La estrategia de salto de exones convierte una mutación fuera de marco en una mutación en marco que conduce a una distrofina delecionada internamente pero parcialmente funcional. Por esta razón, dependiendo del exón o exones saltados, las proteínas restauradas mejorarán al menos los fenotipos distróficos hacia fenotipos tipo Becker más leves. En ciertas realizaciones, la proteína distrofina resultante no es necesariamente la forma de distrofina "tipo salvaje", sino que es más bien una forma de distrofina truncada, pero funcional o semi-funcional. Al aumentar los niveles de la proteína distrofina funcional en las células musculares, estas realizaciones y otras afines pueden ser útiles en la profilaxis y el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. La terapia combinada descrita en esta memoria proporciona ventajas significativas y prácticas sobre los métodos alternativos de tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

La expresión "salto de exones" se refiere generalmente al proceso por el cual un exón entero, o una porción del mismo, se elimina de un pre-mRNA dado, y su presencia queda excluida en el mRNA maduro. Por tanto, la porción de la proteína que está codificada en caso contrario por el exón saltado no está presente en la forma expresada de la proteína, creando típicamente una forma alterada, aunque todavía funcional, de la proteína. En ciertas realizaciones, el exón saltado es un exón aberrante del gen de distrofina humano, que puede contener una mutación u otra alteración en su secuencia. En ciertas realizaciones, el exón saltado es uno cualquiera o más de los exones 1-79 del gen de distrofina, aunque se prefieren uno cualquiera o más de los exones 23, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, y/o 55 del gen de distrofina humano. Dependiendo de la localización de la mutación del paciente de DMD, se seleccionan para ser saltados uno o varios exones a fin de restaurar el marco codificante de la distrofina que conduce a una distrofina delecionada internamente pero parcialmente funcional. La "distrofina" es una proteína citoplásmica en forma de bastón, y una parte vital del complejo proteínico que conecta el citoesqueleto de una fibra muscular con la matriz extracelular circundante a través de la membrana celular. La distrofina contiene múltiples dominios funcionales. Por ejemplo, la distrofina contiene un dominio de fijación de actina en aproximadamente los aminoácidos 14-240 y un dominio central de bastón en aproximadamente los aminoácidos 253-3040. Este gran dominio central está formado por 24 elementos de triple hélice tipo espectrina constituidos por aproximadamente 109 aminoácidos, que tienen homología con alfa-actinina y espectrina. Las repeticiones están interrumpidas típicamente por cuatro segmentos no repetidos ricos en prolina, a los que se hace referencia también como regiones bisagra. Las repeticiones 15 y 16 están separadas por un tramo de 18 aminoácidos que parece proporcionar un sitio principal para la escisión proteolítica de la distrofina. La identidad de secuencia entre la mayoría de las repeticiones oscila entre 10 y 25%. Una repetición contiene tres hélices alfa: 1, 2 y 3. Las hélices alfa 1 y 3 están formadas cada una por 7 vueltas de hélice, que interaccionan probablemente como un serpentín enrollado a través de una interfaz hidrófoba. La hélice alfa 2 tiene una estructura más compleja y está formada por segmentos de cuatro y tres vueltas de hélice, separados por un residuo Glicina o Prolina. Cada repetición está codificada por dos exones, interrumpidos típicamente por un intrón entre la posición del ácido nucleico que codifica los aminoácidos 47 y 48 en la primera

parte de la hélice alfa 2. El otro intrón se encuentra en posiciones diferentes en la región codificante repetida, usualmente dispersada a lo largo de la hélice 3. La distrofina contiene también un dominio rico en cisteína en aproximadamente los aminoácidos 3080-3360), que incluye un segmento rico en cisteína (a saber, 15 cisteínas en 280 aminoácidos) que exhibe homología con el dominio C-terminal del molde de fango (*Dictyostelium discoideum*) alfa-actinina. El dominio carboxi-terminal se encuentra aproximadamente en los aminoácidos 3361-3685.

El término amino de la distrofina se fija a F-actina y el término carboxi se fija al complejo proteínico distrofin-asociado (DAPC) en el sarcolema. El DAPC incluye los distroglucanos, sarcoglucanos, integrinas y caveolina, y las mutaciones en cualquiera de estos componentes causan distrofias musculares heredadas autosómicamente. El DAPC se desestabiliza cuando está ausente distrofina, lo que da como resultado niveles disminuidos de las proteínas miembro, y conduce a su vez a deterioro progresivo de las fibras y pérdida de membrana. En diversas formas de distrofia muscular, tales como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (BMD), las células musculares producen una forma alterada y funcionalmente deficiente de distrofina, o no producen distrofina en absoluto, debido principalmente a mutaciones en la secuencia del gen. La expresión predominante de la proteína distrofina deficiente, o la ausencia total de distrofina o de una proteína tipo distrofina, conduce a la progresión rápida de la degeneración muscular, como se ha indicado anteriormente. A este respecto, una proteína distrofina "deficiente" puede caracterizarse por las formas de distrofina que se producen en ciertos individuos con DMD o BMD, como es conocido en la técnica, o por la ausencia de distrofina detectable.

Como se utilizan en esta memoria, los términos "función" y "funcional" y análogos se refieren a una función biológica, enzimática, o terapéutica. Una proteína distrofina "funcional" hace referencia generalmente a una proteína distrofina que tiene actividad biológica suficiente para reducir la degradación progresiva del tejido muscular que es característica en caso contrario de distrofia muscular, típicamente en comparación con la forma alterada o "deficiente" de la proteína distrofina que está presente en ciertos individuos con DMD o BMD. En ciertas realizaciones, una proteína distrofina funcional puede tener aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% (con inclusión de todos los números enteros intermedios) de la actividad biológica *in vitro* o *in vivo* de la distrofina tipo salvaje, como se mide conforme a los métodos rutinarios empleados en la técnica. Como un ejemplo, la actividad relacionada con distrofina en cultivos musculares *in vitro* puede medirse conforme a tamaño de los miotubos, organización (o desorganización) de las miofibrillas, actividad contráctil, y aglomeración espontánea de los receptores de acetilcolina (17). Los modelos animales son también recursos valiosos para el estudio de la patogénesis de la enfermedad, y proporcionan un medio para ensayar la actividad relacionada con la distrofina. Dos de los modelos animales más ampliamente utilizados para investigación de la DMD son el ratón *mdx* y el perro con distrofia muscular Golden Retriever (GRMD), los dos cuales son negativos para distrofina (véase, p. ej., Collins & Morgan, *Int J Exp Pathol* 84: 165-172, 2003). Éstos y otros modelos animales pueden utilizarse para medir la actividad funcional de diversas proteínas distrofina. Se incluyen formas truncadas de distrofina, tales como las formas que son producidas por algunos de los compuestos antisentido de salto de exones de la presente invención.

El AON aislado de la invención puede ser de cualquier tipo adecuado. Tipos AON representativos incluyen oligodesoxirribonucleótidos, oligorribonucleótidos, morfolinos (tales como fosforodiamidato-morfolino (PMO) o péptido-fosforodiamidato-morfolino (PPMO)), 2'-O-metil-fosforotioato (2'OMePS), oligonucleótidos antisentido 2'-O-2-metoxietilo, oligonucleótidos antisentido triciclo-DNA, oligonucleótidos triciclo-fosforotioato DNA, LNA, AONs modificados con RNA nuclear pequeño tales como AONs modificados con U7, U1 o U6 (u otros UsnRNPs), o productos conjugados de los mismos tales como AONs conjugados con péptidos o complejados con nanopartículas.

En particular, para uso *in vivo*, los AONs pueden estabilizarse, por ejemplo, por vía de modificaciones en la cadena principal de fosfato. Por ejemplo, los AON estabilizados de la presente invención pueden tener una cadena principal modificada, teniendo p. ej. enlaces fosforotioato. Otras modificaciones estabilizadoras posibles incluyen modificaciones fosfodiéster, combinaciones de modificaciones fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato fosforoditioato, p-etoxi, y combinaciones de las mismas. Versiones modificadas de los AONs estabilizadas químicamente incluyen también "Morfolinos" (oligómeros fosforodiamidato-morfolino, PMOs), oligómeros 2'-O-Metilo, triciclo-DNAs, moléculas triciclo-DNA-fosforotioato (WO2013/053928) o U RNAs nucleares pequeños (sn). Las últimas formas de AONs que pueden utilizarse a este efecto pueden estar acopladas a moléculas nucleares pequeñas de RNA tales como as U1, U6 o U7 (u otros UsnRNPs).

En una realización particular, el AON aislado utilizado en la presente invención es un oligonucleótido 2'OMePS o un oligonucleótido PPMO. Preferiblemente, el AON es un oligonucleótido PPMO.

Los AONs empleados en la práctica de la invención tienen generalmente una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos, y pueden ser, por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 10, o

aproximadamente 15, o aproximadamente 20, o aproximadamente 25, o aproximadamente 30, o aproximadamente 35, o aproximadamente 40 nucleótidos de longitud o más, dependiendo de las secuencias direccionadas dentro del pre-mRNA de distrofina y la química del AON.

5 Un AON representativo para la práctica de la invención puede ser GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT (SEQ ID NO:1), efectuando el salto del exón 23 del pre-mRNA de distrofina de ratón.

Por supuesto, en la práctica de la presente invención puede utilizarse cualquier AON que tenga las propiedades descritas anteriormente.

En una realización, el AON aislado de la invención tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, y es un oligonucleótido PPMO.

10 Para suministro estable y eficiente in vivo, los AONs aislados utilizados en la práctica de la presente invención pueden fusionarse o coadministrarse también con cualesquiera péptidos penetrantes en las células y con péptidos señal mediadores de la secreción de proteínas. Los péptidos penetrantes en las células pueden ser péptidos RVG (18), PiP (19) tales como Pip6a-PMO (20), P28 (21), o dominios de transducción de proteínas como TAT (22) o VP22 (23). En una realización particular, el AON aislado es un oligonucleótido PPMO,

15 es decir, un oligonucleótido PMO fusionado a un resto peptídico, más particularmente un Pip6a-PMO, todavía más particularmente un Pip6a-PMO. En una realización particular, el resto oligonucleotídico PPMO comprende o consiste en la secuencia representada en SEQ ID NO:1. En una realización particular adicional, el AON aislado es un Pip6a-PMO cuyo resto oligonucleotídico comprende o consiste en la secuencia representada en SEQ ID NO:1.

20 Adicionalmente, el AON aislado utilizado en la práctica de la invención puede administrarse como una composición que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y un reactivo que mejora la eficacia de suministro del oligonucleótido. Un reactivo de este tipo puede incluir, sin limitación, F127 (24).

25 En una realización particular de la invención, el AON aislado de la invención es capaz de inducir una expresión de distrofina funcional de al menos 10%, preferiblemente de al menos 20%, preferiblemente de al menos 30%, preferiblemente de al menos 40%, preferiblemente 50%, más preferiblemente al menos 51%, 52%, 53%, 54%, 55% o al menos 56%, en comparación con el nivel normal de expresión de la distrofina tipo salvaje. Por supuesto, es también preferible una expresión mayor de distrofina funcional, tal como una expresión de al menos 60%, 70%, 80% o incluso de al menos 90%, en comparación con el nivel normal de dispersión de la distrofina tipo salvaje.

30 En el segundo paso del método de la invención, se administra también un vector viral que codifica un producto terapéutico al mismo paciente que se halla en necesidad del tratamiento. En el contexto de la presente invención, el producto terapéutico es capaz de restaurar una función de distrofina en una célula muscular que se halla en necesidad de ello.

35 En una realización particular, el vector viral que codifica un producto terapéutico es un virus codificante de AON. El AON codificado por este virus es como se ha definido anteriormente, y es capaz de inducir salto de exones en un pre-mRNA de distrofina y de inducir las células musculares a producir un transcrito de mRNA que codifica una proteína distrofina funcional.

40 En otra realización específica, el vector viral, o varios vectores virales, codifica medios para corregir el gen de distrofina en el genoma de una célula muscular. En esta realización, el vector viral capaz de restaurar la función de distrofina en una célula muscular está diseñado para corregir un gen de distrofina mutante en un individuo por introducción en el genoma de dicha célula de un sistema de edición del genoma. Por ejemplo, una nucleasa específica de sitio puede estar codificada por el vector viral, el cual puede restaurar la expresión de una proteína distrofina total o parcialmente funcional con un DNA modelo de reparación o donante, que puede reemplazar el gen de distrofina entero o la región que contiene la mutación. La nucleasa específica de sitio puede ser utilizada para introducir roturas de la doble cadena específicas de sitio en loci genómicos direccionados. Roturas de la doble cadena específicas de sitio se crean cuando la nucleasa específica de sitio se fija a una secuencia de DNA diana, permitiendo con ello la escisión del DNA diana. Esta escisión del DNA puede estimular la maquinaria natural de reparación del DNA, conduciendo a uno de dos caminos de reparación posibles: reparación dirigida por homología (HDR) o el camino de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Esta realización puede comprender la introducción en la célula muscular de un medio de edición del genoma que implementa una o más endonucleasas (por ejemplo, una o más meganucleasa(s), TALEN(s), ZFN(s) o una endonucleasa CRISPR/Cas9) específica para el gen de distrofina y una o más matrices de reparación. Tales sistemas se

describen y son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, en WO11036640, WO13163628, WO14009567 y WO14197748.

En otra realización, el producto terapéutico codificado por el vector viral es una distrofina funcional. Como se ha mencionado anteriormente, el término proteína distrofina "funcional" hace referencia generalmente a una proteína distrofina que tiene actividad biológica suficiente para reducir la degradación progresiva del tejido muscular que es característica en caso contrario de la distrofia muscular, típicamente en comparación con la forma alterada o "deficiente" de la proteína distrofina que está presente en ciertos individuos con DMD o BMD. En ciertas realizaciones, una proteína distrofina funcional puede tener aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% (con inclusión de todos los números enteros intermedios) de la actividad biológica in vitro o in vivo de la distrofina tipo salvaje, como se mide conforme a métodos rutinarios en la técnica. La proteína distrofina funcional puede ser una proteína distrofina truncada, tal como una mini- o micro-distrofina. Tales mini- y micro-distrofinas se conocen en la técnica, por ejemplo, en WO02/29056, WO01/83695, WO08/088895 y Foster et al., 2008 (37). En una realización particular, la micro-distrofina es una micro-distrofina Δ AB/R3-R18/ Δ CT o Δ R4-R23/ Δ CT (más particularmente una micro-distrofina Δ R4-R23/ Δ CT), tal como la micro-distrofina Δ AB/R3-R18/ Δ CT o Δ R4-R23/ Δ CT descrita en Foster et al., 2008, más particularmente la micro-distrofina Δ R4-R23/ Δ CT. En otra realización particular, el gen codificante de la mini- o micro-distrofina está optimizado en codones. En otra realización particular, el gen codificante de la mini- o micro-distrofina está optimizado en codones y codifica la micro-distrofina Δ AB/R3-R18/ Δ CT o Δ R4-R23/ Δ CT, en particular la micro-distrofina Δ R4-R23/ Δ CT descrita en Foster et al., 2008. Las secuencias codificantes correspondientes se representan en SEQ ID NO: 6 y 7 respectivamente.

El suministro de micro-distrofinas mediado por el vector viral adeno-asociado (AAV) en ratones deficientes en distrofina con DMD ha demostrado una eficacia notable (25, 26, 27) que ha conducido a la iniciación de una prueba clínica en fase inicial (28).

Vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores virales no integradores (o vectores que integran el genoma de la célula diana con baja eficacia) tales como vectores mantenidos episómicamente, con inclusión de adenovirus; parvovirus tales como virus adeno-asociados; virus tipo SV40. Pueden emplearse fácilmente otros vectores no citados pero conocidos en la técnica. Entre los vectores que han sido validados para aplicaciones clínicas y que pueden utilizarse para suministrar las secuencias antisentido, los AAVs exhiben un mayor potencial para la estrategia de salto de exones.

En una realización preferida, el vector viral es un parvovirus, en particular un vector de AAV. El parvovirus Virus Adeno-Asociado (AAV) es un dependovirus que es naturalmente deficiente para replicación y que es capaz de integrarse en el genoma de la célula infectada para establecer una infección latente. La última propiedad parece ser exclusiva entre los virus de mamífero, dado que la integración ocurre en un sitio específico en el genoma humano, llamado AAVS1, localizado en el cromosoma 19 (19q13. 3-qter). Los vectores recombinantes basados en AAV carecen de la proteína Rep y se integran con baja eficacia, estando presentes principalmente como episomas circulares estables que pueden persistir durante meses y posiblemente años en las células diana. Por esta razón, AAV ha suscitado considerable interés como vector potencial para terapia génica en humanos. Entre las propiedades favorables del virus están su falta de asociación con cualquier enfermedad humana y la extensa gama de líneas de células derivadas de diferentes tejidos que pueden ser infectadas. Actualmente se conocen 12 serotipos de AAV (AAV1 a 12) y hasta 120 variantes (29; 30), cada una con diferentes tropismos tisulares. Conforme a ello, la presente invención se refiere a un vector de AAV que codifica el AON descrito anteriormente, estando direccionado a un pre-mRNA de distrofina y adaptado para inducir salto de exones en dicho pre-mRNA humano y para inducir la producción de una proteína distrofina funcional en las células musculares. Conforme a una realización particular, el genoma de AAV se deriva de un serotipo AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12. En una realización preferida, la cápsida de AAV se deriva de un serotipo AAV o variantes de AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12. En una realización particular adicional, el vector de AAV es un vector pseudotipificado, es decir su genoma y su cápsida se derivan de AAVs de diferentes serotipos. Por ejemplo, el vector de AAV pseudotipificado puede ser un vector cuyo genoma se deriva del serotipo AAV2, y cuya cápsida se deriva de los AAVs o variantes de AAV serotipos AAV 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12. Adicionalmente, el genoma del vector de AAV puede ser un genoma monocatenario o bicatenario autocomplementario (31). Los vectores AAV bicatenarios autocomplementarios se generan por delección del sitio de resolución terminal (trs) de una de las repeticiones terminales de AAV. Estos vectores modificados, cuyo genoma de replicación tiene la mitad de la longitud del genoma de AAV tipo salvaje, tienen la tendencia a empaquetar dímeros de DNA.

Preferiblemente, el vector de AAV implementado en la práctica de la presente invención es un vector que está direccionado a las células musculares. En particular, AAV 1, 6, 8 y 9 exhiben un tropismo elevado para músculos estriados (Zincarelli Mol Ther. 2008; Schultz Mol Ther. 2008) y son particularmente preferidos. En una realización

preferida, el vector de AAV tiene una cápsida de AAV 1, 6, 8 ó 9, estando este vector opcionalmente pseudotipificado.

En una realización particular, el AON codificado por el vector AON-codificante que se ha descrito anteriormente está ligado a una molécula de RNA nuclear pequeño tal como U1, U2, U6, U7 o cualquier otro RNA nuclear pequeño (snRNA), o RNA nuclear pequeño quimérico (32; 33). Información acerca de la modificación de U7 puede encontrarse particularmente en Goyenvalle, et al. (34); WO2011/113889; y WO2006/021724. En una realización particular, se utiliza la casete U7 descrita por D. Schumperli (35). La misma comprende el promotor natural de U7 (posición -267 a +1), el snRNA U7smOpt y la secuencia de aguas abajo hasta la posición 116. La secuencia natural de 18 nt complementaria de pre-mRNAs de histona en el snRNA U7 se reemplaza por una o dos (que pueden ser la misma secuencia utilizada dos veces, o dos secuencias diferentes) o más repeticiones de las secuencias AONs seleccionadas utilizando, por ejemplo, mutagénesis mediada por PCR, como ya se ha descrito (34).

En una realización particular, el AON modificado con U7 comprende la secuencia representada en SEQ ID NO:2: GGCAAACCTCGGCTTACCTAAATAGAAGTTCATTTACTACTAAC (SEQ ID NO:2).

En una realización particular, los AONs modificados con RNA nuclear pequeño, en particular los AONs modificados con U7, están vectorizados en un vector de AAV.

Típicamente, el vector viral, particularmente el vector codificante de distrofina funcional o el vector codificante de AON puede comprender también secuencias reguladoras que permiten la expresión de la distrofina funcional codificada o AONs, tales como p. ej., un promotor, sitios de entrada de ribosoma intensificadores internos (IRES), secuencias codificantes de dominios de transducción de proteínas (PTD), etc. A este respecto, el vector comprende muy preferiblemente una región promotora, enlazada operativamente a la secuencia codificante, para causar o mejorar la expresión del AON.

Un promotor de este tipo puede ser ubicuo, específico de tejido, fuerte, débil, regulado, quimérico, etc., para permitir la producción eficiente y adecuada del AON. El promotor puede ser un promotor celular, viral, fúngico, vegetal o sintético. Los promotores más preferidos para uso en la presente invención deben ser funcionales en células musculares. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de músculo incluyen el promotor desmina, el promotor sintético C5-12 y el promotor muscular creatina-quinasa (MCK). En cuanto a su aspecto con relación a la expresión de un AON, los motores pueden seleccionarse de promotores de RNA nuclear pequeño tales como U1, U2, U6, U7 u otros promotores de RNA nuclear pequeño, o promotores quiméricos de RNA nuclear pequeño. Otros promotores representativos incluyen promotores dependientes de RNA polimerasa III, tales como el promotor H1, o promotores dependientes de RNA polimerasa II. Ejemplos de promotores regulados incluyen, sin limitación, promotores que contienen elementos Tet on/off, promotores inducibles por rapamicina y promotores metalotioneína. Ejemplos de promotores ubicuos incluyen promotores virales, particularmente el promotor CMV, el promotor RSV, el promotor SV40, el promotor CBA híbrido (beta-actina de pollo/CMV), etc. y promotores celulares tales como los promotores PGK (fosfoglicerato-quinasa) o EF1 alfa (Factor de Elongación 1alfa).

La invención se refiere también a una composición que comprende el AON aislado o el vector viral, como se ha descrito anteriormente, en un portador farmacéuticamente aceptable. Además del AON o el virus, una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir también un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable tal como solución salina, fosfato de sodio, etc. La composición se encontrará generalmente en forma de un líquido, aunque esto no es absolutamente necesario. Portadores, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfatos de calcio, alginato, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe acuoso, metilcelulosa, propilhidroxibenzoatos de metilo y propilo, aceite mineral, etc. La formulación puede incluir también agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, conservantes, agentes tampón, etc. En particular, la presente invención implica la administración de un AON o virus codificante de AON aislado y es por tanto algo análoga a la terapia génica. Los expertos en la técnica reconocerán que los ácidos nucleicos se suministran a menudo en conjunción con lípidos (p. ej. lípidos catiónicos o lípidos neutros, o mezclas de éstos), frecuentemente en forma de liposomas u otro material adecuado micro- o nano-estructurado (p. ej. micelas, lipocomplejos, dendrímeros, emulsiones, fases cúbicas, etc.).

Las composiciones de la invención se administran generalmente por rutas enterales o parenterales, p. ej. por vía intravenosa (i. v.), intra-arterial, subcutánea, intramuscular (i. m.), intracerebral, intracerebroventricular (i. c. v.), intratecal (i. t.), Intraperitoneal (i. p.), aunque no se excluyen otros tipos de administración.

Pueden formularse preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles conforme a la técnica conocida utilizando agentes de dispensación o humectantes adecuados y agentes de

suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión estéril inyectable en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Si bien el suministro puede ser local (es decir in situ, directamente en un tejido tal como tejido muscular) o sistémico, usualmente el suministro será local en el tejido muscular afectado, p. ej. en el músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, etc. Dependiendo de la forma del AON o el vector viral que se administra y el tejido o tipo de célula al que está direccionado, pueden emplearse técnicas tales como electroporación, sonoporación, un "cañón de genes" (que suministra partículas de oro recubiertas de ácido nucleico), etc.

Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad de un AON aislado o de un vector viral aislado a administrar será una cantidad que es suficiente para inducir la mejora de los síntomas de distrofia muscular indeseables. Dicha cantidad puede variar, dependiendo entre otras cosas de factores tales como el sexo, la edad, el peso, el estado físico general del paciente, etc., y puede determinarse sobre una base de caso por caso. La cantidad puede variar también conforme a otros componentes de un protocolo de tratamiento (p. ej. la administración de otros medicamentos, etc.). Generalmente, una dosis adecuada está comprendida en el intervalo que va desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, y con más frecuencia desde aproximadamente 2 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg. En el caso de suministro de AON de base viral, las dosis adecuadas dependerán de factores diferentes tales como el virus que se emplee, la ruta de administración (intramuscular, intravenosa, intra-arterial u otra), pero típicamente pueden variar desde 10^9 a 10^{15} partículas virales/kg. Los expertos en la técnica reconocerán que tales parámetros se determinan normalmente durante pruebas clínicas. Adicionalmente, los expertos en la técnica reconocerán que, si bien los síntomas de la enfermedad pueden ser aliviados completamente por los tratamientos descritos en esta memoria, esto no ocurre necesariamente. Incluso un alivio parcial o intermitente de los síntomas puede ser de gran beneficio para el receptor. Adicionalmente, el tratamiento del paciente puede tener lugar una sola vez, o el paciente es administrado con el AON y/o el vector viral en múltiples ocasiones, que pueden estar, dependiendo de los resultados obtenidos, separadas varios días, separadas varias semanas, o separadas varios meses, o incluso separadas varios años.

La presente invención se refiere por tanto al tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, que comprende una administración en dos pasos de:

- primeramente un oligonucleótido antisentido aislado que es complementario de una parte del pre-mRNA de distrofina y es capaz de inducir salto de exones durante el procesamiento de este pre-mRNA a un mRNA; y
- en segundo lugar, un vector viral que codifica un producto terapéutico de la distrofia muscular de Duchenne, tal como
 - (i) codificando un oligonucleótido antisentido capaz de inducir salto de exones en un pre-mRNA de distrofina,
 - (ii) codificando medios de edición del gen de distrofina, o
 - (iii) codificando una distrofina funcional.

En una realización particular, el producto terapéutico es un AON modificado con U7, en particular un AON modificado con U7 que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 2, que está direccionada al exón 23 del gen de distrofina.

Como se ha descrito anteriormente, se cree que la primera administración del AON aislado induce una expresión suficiente de distrofina funcional en las células musculares para asegurar la integridad de la membrana, y limita por tanto la pérdida de vectores virales, en particular de virus codificantes de AON (p. ej. AAVs), virus correctores de distrofina (p.ej., AAVs), o virus codificantes de distrofina funcional (p.ej., AAVs), debida a ciclos de necrosis-regeneración de la miofibra distrófica repetidos en caso contrario.

El periodo de tiempo entre la inyección del AON aislado y el vector viral puede variar dependiendo de cierto número de factores, tales como la fase de la enfermedad, la edad o condición del paciente, y la dosificación de la terapia. En cualquier caso, el tiempo entre los pasos primero y segundo del presente método es suficiente para proporcionar un beneficio de larga duración del tratamiento con el vector viral. El método presente permite el mantenimiento de un contenido elevado del genoma terapéutico viral y una expresión mejorada del transgén en los músculos distróficos. Las consecuencias de estos eventos iniciales son un beneficio terapéutico mayor de la terapia basada en AAV más verdadero que la terapia no combinada. Conforme a ello, el tiempo entre el primer y el segundo paso del método de la invención puede ser de 1 a 40 días, tal como al menos uno o más días, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40 días; o de al menos una o más semanas, tal como al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 semanas. En una realización particular, el periodo de tiempo entre ambas administraciones es de dos semanas, (es decir de aproximadamente 12 a 16 días, tal como de aproximadamente 12, 13, 14, 15 ó 16 días), aproximadamente tres semanas (es decir de aproximadamente 19 a 23 días, tal como de aproximadamente 19, 20, 21, 22 ó 23 días) o aproximadamente cuatro semanas (es decir de aproximadamente 26-30 días, tal como de aproximadamente 26, 27, 28, 29 ó 30 días). Más particularmente, este periodo de tiempo está comprendido entre 14 y 28 días, y más particularmente

es de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ó 28 días. En otra realización, el periodo de tiempo entre ambas administraciones es de aproximadamente 14 (es decir 13, 14 ó 15 días, más específicamente, 14 días), 21 (es decir, 20, 21 ó 22 días, más específicamente 21 días) o 28 días (es decir 27, 28 ó 29 días, más específicamente 28 días).

- 5 Aspectos y ventajas adicionales de las presentes invenciones se describirán en la sección experimental siguiente, que debe considerarse únicamente como ilustrativa, y no limitante del alcance de esta solicitud.

Leyenda de las figuras

Figura 1. Los genomas virales se mantienen eficientemente en los músculos *mdx* restaurados con Pip6a-PMO

- 10 (a) Se inyectaron TAs de ratones *mdx* y tipo salvaje con 1 nmol de Pip6a-PMO dos semanas antes (-2w) de la inyección de 1E+11 vg del vector no terapéutico AAV1-U7scr (día 0, d0). Se inyectaron los TAs *mdx* y wt de control con vector de AAV1-U7scr solo. Se inyectaron cuatro TAs por grupo. Los ratones se sacrificaron 3 semanas después (3w). (b) Restauración de distrofina monitorizada por inmunotinción con el anticuerpo monoclonal NCL-DYS2 en secciones transversales de músculos TA. Se muestra una sección representativa inmunoteñida por condición. (c) Restauración de la distrofina evaluada por transferencia western con los anticuerpos monoclonales NCL-DYS1 (panel superior) en extractos de proteínas totales de los músculos tratados con PPMO (panel inferior: α -actinina). La restauración de la distrofina se cuantificó por software ImageJ y se expresó como el porcentaje de la expresión de distrofina en el músculo tipo salvaje. (d) Cuantificación de los genomas de AAV por qPCR Taqman absoluta. El contenido de genoma de AAV se expresa como el número de genomas de AAV con relación al valor obtenido para los músculos *mdx* no tratados con PPMO. Los datos representan los valores medios de 4 músculos por grupo \pm SEM. n. s.: no significativo, ***p < 0,001, test t de Student. Se muestra uno de dos experimentos representativos.

Figura 2. El pre-tratamiento con Pip6a-PMO permite una restauración importante de distrofina a dosis baja de AAV-U7ex23 al cabo de 6 meses

- 25 (a) Se inyectaron TAs *mdx* con 1 nmol de Pip6a-PMO dos semanas antes (-2w) de la inyección de 1E+10 vg del vector terapéutico AAV1-U7ex23 (día 0, d0). Se inyectaron TAs *mdx* de control con PPMO o vector de AAV1-U7ex23 solo. Se inyectaron cuatro TAs por grupo. Los ratones se sacrificaron 6 meses más tarde (6m). (b) Nivel de salto del exón 23 estimado por RT-PCR anidada. El producto PCR de 901 pb corresponde a transcritos de distrofina de longitud total, mientras que el producto de 688 pb corresponde a transcritos que carecen del exón 23. (c) Cuantificación del salto del exón 23 realizada por qPCR TaqMan relativa y expresada como porcentaje de los transcritos de distrofina totales. (d) Cuantificación de los genomas de AAV por qPCR Taqman absoluta. El contenido de genoma de AAV se expresa como el número de genomas de AAV con relación al valor obtenido para los músculos *mdx* no tratados con PPMO. Los datos presentados en (c) y (d) representan los valores medios de las cuatro TAs por grupo \pm SEM. *p < 0,05, ***p < 0,001, test t de Student. (e) Restauración de distrofina evaluada por transferencia western con anticuerpos monoclonales NCL-DYS1 (panel superior) en extractos de proteínas totales de los músculos tratados (panel inferior: α -actinina). La restauración de la distrofina se cuantificó por software ImageJ y se expresó como el porcentaje de la expresión de distrofina en el músculo tipo salvaje.

Figura 3. Efecto del pre-tratamiento con Pip6a-PMO sobre la terapia génica con micro-distrofina mediada por AAV1

- 40 (a) Se inyectaron TAs *mdx* con 1 nmol de Pip6a-PMO dos semanas antes (-2w) de la inyección de 1E+10 vg del vector de expresión de micro-distrofina AAV1-MD1 (día 0, d0). Se inyectaron TAs *mdx* de control con PPMO o vector de AAV1-MD1 solo. Se inyectaron cinco TAs por grupo. Los ratones se sacrificaron 4 semanas más tarde (4w). (b) Cuantificación de los genomas de AAV por qPCR Taqman absoluta. El contenido de genoma de AAV se expresa como el número de genomas de AAV con relación al valor obtenido para los músculos *mdx* no tratados con PPMO. Los datos representan los valores medios de los 5 músculos por grupo \pm SEM. *p < 0,05, test t de Student. (c) Expresión de distrofina inducida por PPMO (DYS, 427 kDa) y micro-distrofina (μ DYS, 132 kDa) evaluada por transferencia western con anticuerpos monoclonales MANEX1011B (panel superior) en extractos de proteínas totales de los músculos tratados (panel inferior: α -actinina).

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Producción del vector viral y experimentos en animales

- 50 Se utilizó un protocolo de transfección de tres plásmidos con los plásmidos pAAV(U7smOPT-SD23/BP22), pAAV(U7smOPT-scr) y p Δ R4-R23/ Δ CT (MD1) para generación de los vectores monocatenarios AAV1-U7ex23

- (7), AAV1-U7scr (13) y AAV1-MD1 (37). Los títulos de vector se determinaron por PCR en tiempo real y se expresaron como genomas de vector por ml (vg/ml). Se inyectaron ratones *mdx* de tres meses de edad en los músculos Tibial anterior (TA) con 1 nmol de oligonucleótidos Pip6a-PMO (GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT - SEQ IDNO:1) (20). Adicionalmente, se inyectaron 50 µl of AAV1-U7scr, AAV1-U7ex23 o AAV1-MD1 que contenían 1E+10 o 1E+11 vg en TAs C57BL/6 (wt) o *mdx*. Estos experimentos en animales se realizaron en el Myology Research Center, París, Francia, conforme a las directrices y protocolos aprobados por el Institutional Review Board. Se inyectaron un mínimo de cuatro ratones por grupo para cada experimento. En el momento del sacrificio, se recogieron los músculos, se congelaron rápidamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.
- 5
- 10 **Cuantificación de los genomas virales**
- Se extrajo DNA genómico de músculos de ratón utilizando el kit Puregene Blood (Qiagen). Se midieron los números de copias de los genomas de AAV y el DNA genómico sobre 100 ng de DNA genómico por PCR absoluta cuantitativa en tiempo real en un StepOnePlus™ (Applied Biosystems) utilizando la Mezcla Maestra TaqmanR Universal (Applied Biosystems). Se utilizaron cebadores (directo: CTCCATCACTAGGGGTTCCCTTG (SEQ ID NO:3) e inverso: GTAGATAAGTAGCATGGC (SEQ IDNO:4)) y sonda (TAGTTAATGATTAACCC (SEQ ID NO:5)) para amplificar específicamente la secuencia del genoma viral. Como muestra de referencia, se diluyó 10 veces en serie un plásmido pAAV (desde 10⁷ a 10¹ copias). Todas las muestras de DNA genómico se analizaron por duplicado.
- 15
- Análisis RT-PCR**
- 20 Se analizó RNA total de músculo de ratón con NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel), y se realizó una transcripción inversa (RT) sobre 200 ng de RNA utilizando Superscript™ II y cebadores aleatorios (Life Technologies). Los transcritos de distrofina sin salto y con salto se detectaron por PCR anidada y se cuantificaron como se ha descrito (9).
- Análisis por transferencia western**
- 25 Se obtuvieron extractos de proteínas de secciones musculares agrupadas tratadas con sacarosa 125 mM, Tris-HCl 5 mM de pH 6,4, 6% de Tampón de Tricina XT (Bio-Rad), 10% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol. Las muestras se purificaron con el Juego de Reactivos Pierce Compat-Able™ Protein Assay Preparation (Thermo Scientific) y se determinó la concentración total de proteínas con el Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos y se cargaron 100 µg de proteína en gel prefabricado de Tris-acetato Criterion XT al 3-8% (Bio-Rad). La membrana se sondó con anticuerpos monoclonales primarios dirigidos contra distrofina (NCL-DYS1, 1:50, Leica Biosystems; MANEX1011B, 1:50, donado amablemente por The Muscular Dystrophy Association Monoclonal Antibody Resource (38)) y α-actinina (1:1000, Sigma-Aldrich), seguido por incubación con un anticuerpo secundario anti-ratón de oveja (conjugado con peroxidasa de rábano picante; 1:15000) y Pierce ECL western Blotting Substrate (Thermo Scientific).
- 30
- 35 **Inmunohistoquímica**
- Se cortaron secciones TA de 12 µm y se examinaron respecto a la expresión de distrofina utilizando el anticuerpo monoclonal NCL-DYS2 (1:50; Leica Biosystems) y un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra Alexa 488 (1:1000; Life Technologies).
- Resultados**
- 40 **Efecto de la restauración de distrofina por pretratamiento con AON sobre el mantenimiento no terapéutico del genoma viral**
- A fin de inducir la expresión temporal de distrofina en el sarcolema de las miofibras *mdx*, se inyectaron músculos Tibialis anterior (TA) con 11 µg de Pip6a-PMO (20), un oligonucleótido antisentido de péptido-fosforodiamidato morfolino (PPMO) que es particularmente eficiente para salto de exones *mdx*. Los vectores no terapéuticos AAV-U7scr (que llevaban una secuencia codificada, inespecífica) se inyectaron en los mismos músculos dos semanas más tarde (Fig. 1a), cuando la restauración de distrofina fue óptima, a una dosis alta (1E+11 genomas virales). Los autores de la invención habían demostrado previamente que estos vectores U7scr, que son incapaz de inducir salto de exones y por tanto de restaurar la expresión de distrofina, se pierden drásticamente en el transcurso de tres semanas del músculo *mdx* deficiente en distrofina (13).
- 45
- 50 Posteriormente al pretratamiento con AON inductor del salto de exones, tres semanas después de la inyección con AAV1-U7scr, la tinción de inmunofluorescencia reveló una restauración fuerte de distrofina y su correcta localización

en el sarcolema en los músculos mdx inyectados (Fig. 1b). Los niveles de distrofina se cuantificaron en los músculos mdx por transferencia western y se demostró que el pre-tratamiento con AON daba como resultado una restauración de 56 a 98% de cuasi-distrofina comparada con los niveles normales (Fig. 1c). Como se esperaba (13), el contenido de genoma viral analizado por PCR cuantitativa (qPCR) era 6 veces mayor en los músculos tipo salvaje (wt) que en los músculos mdx sin tratar con AON. Es interesante, que el contenido de genoma viral analizado por qPCR en el grupo mdx tratado con AON es similar al observado en los músculos wt (Fig. 1d). Por consiguiente, una expresión significativa de distrofina inducida por pre-tratamiento con PPMO el momento de la inyección de AAV1-U7scr protege contra la pérdida rápida de genomas de AAV1-U7scr en los músculos mdx comparable a la que se observaba en los músculos wt.

10 Efecto del tratamiento con Pip6a-PMO sobre la restauración de la distrofina a dosis baja de AAV-U7ex23 terapéutico

Los vectores AAV1 que codifican el U7ex23 (AAV1-U7ex23) hacen posible el salto eficiente del exón 23 y por consiguiente la restauración de cuasi-distrofina en los músculos mdx. Para evaluar el beneficio de un pre-tratamiento con AON sobre la restauración de cuasi-distrofina por la vía de AAV1-U7ex23, se inyectaron 11 µg de oligonucleótidos antisentido Pip6a-PMO en TAs mdx dos semanas antes de la inyección de vectores AAV1-U7ex23 (Fig. 2A). Se seleccionó una dosis de vector baja (1E+10 genomas virales) dado que esta dosis hace posible una restauración débil de cuasi-distrofina (menor del 5% de los niveles normales) (13).

El beneficio de la inyección de AAV1-U7ex23 se analizó seis meses más tarde, cuando la restauración de la distrofina inducida por la inyección simple de PPMO se había anulado prácticamente. Los niveles de salto del exón 23 analizados por RT-PCR anidada (Fig. 2b) y cuantificados por qPCR (Fig. 2c) en TAs mdx tratados con AAV1-U7ex23 o PPMO solo eran bajos como se esperaba, respectivamente 9 y 6% de los transcritos con salto, conduciendo a la síntesis de alrededor del 2% del nivel normal de distrofina restaurada (Fig. 2e). Inversamente, los TAs tratados secuencialmente con PPMOs y AAV1-U7ex23 exhibían 54% de transcritos con salto (Fig. 2c) y 20% de los niveles normales de distrofina (Fig. 2e). El número de copias del genoma de AAV cuantificado por qPCR absoluta era 8 veces mayor en los músculos que recibieron el tratamiento dual PPMO/ AAV1-U7ex23 que en los músculos inyectados solamente con AAV1-U7ex23 (Fig. 2D). Estos datos demuestran que el pretratamiento con PPMO permitía un mantenimiento mejor de los genomas terapéuticos de U7ex23 en los músculos mdx seis meses después de las inyecciones de AAV-U7 y conducía notablemente a una mejora de 10 veces en la cantidad de distrofina restaurada.

El pretratamiento con Pip6a-PMO aumenta significativamente la eficacia de la terapia génica con micro-distrofina mediada por AAV1

30 Para evaluar la eficacia de un pre-tratamiento con AON sobre la terapia génica con AAV-micro-distrofina, se inyectaron AONs Pip6a-PMO en TAs mdx dos semanas antes de la inyección de vector de AAV1-MD1 (1E+10 vg) que expresaba una micro-distrofina murina (MD1) (37) (Fig. 3a). Cuatro semanas más tarde, se observó una restauración fuerte de distrofina en los TAs mdx tratados con PPMO, inducida por el pre-tratamiento con PPMO (Fig. 3c). El número de copias del genoma de AAV y la expresión de micro-distrofina eran 3 veces mayores en los músculos tratados con PPMO/AAV1-MD1 que en los músculos tratados solamente con AAV1-MD1 (Fig. 3b&c), ilustrando el beneficio del pretratamiento con PPMO sobre la terapia génica con AAV-micro-distrofina. Este experimento establece la prueba de concepto de que el pre-tratamiento con AON es capaz de mejorar todas las terapias génicas basadas en AAV para la DMD.

Discusión

40 Los genomas de AAV se pierden rápidamente de los músculos distróficos durante la terapia de salto de exones mediada por AAV-U7, debido sin duda a su naturaleza episómica y a la fragilidad de las fibras musculares distróficas que sufren ciclos de necrosis/generación, presentan membranas anormalmente permeables, y se caracterizan adicionalmente por excreción aumentada de exosomas y micropartículas (36). Los autores de la invención han demostrado aquí que una restauración significativa de cuasi-distrofina (>60%) después de pre-tratamiento con PPMO en el momento de las inyecciones de AAV-U7 hace posible un mantenimiento deficiente de los genomas virales en los músculos mdx tres semanas más tarde. Adicionalmente, este mantenimiento inicial de los genomas virales aumenta la restauración de cuasi-distrofina por AAV-U7, alrededor de 6 veces al nivel del RNA y alrededor de 10 veces al nivel de proteínas seis meses más tarde.

50 El pre-tratamiento con PPMO daba como resultado una expresión sustancial de distrofina en el momento de la inyección de AAV-U7. Esto reduce probablemente, como en el músculo normal de control, las anomalías de membrana que conducen a una pérdida de genoma de AAV antes que ocurra la expresión de cuasi-distrofina inducida por AAV-U7. Una vez establecida, se mantendrá una expresión alta de cuasi-distrofina mediada por AAV-U7, dado que prevendrá por sí misma la pérdida de transgenes. Por consiguiente, al hacer posible el mantenimiento de un contenido alto de genoma viral en el período crítico entre la inyección de AAV y la expresión de transgenes mediada

por AAV en los músculos distróficos tratados, la restauración de cuasi-distrofina mediada por PPMO garantiza un beneficio de larga duración del tratamiento con AAV-U7.

5 Este pre-tratamiento podría ser inducido por cualesquiera AONs que hagan posible una restauración sustancial de cuasi-distrofina (es decir, la utilización de diferentes mutaciones que puedan saltarse y diferentes secuencias diana y químicas de AON distintas tales como triciclo-DNA (36)) utilizando el principio aquí demostrado con la química de PPMO.

10 Este pre-tratamiento con AON es aplicable a todas las estrategias terapéuticas para la miopatía de Duchenne que utilizan vectores AAV, en particular el salto de exones mediado por AAV-U7 y la terapia génica clásica con transferencia de cDNAs de micro-distrofina funcional en los músculos, como se demuestra gracias a los datos presentados en esta memoria.

En vísperas de pruebas clínicas que utilicen terapias basadas en AAV para pacientes de DMD, este estudio pone de manifiesto el fuerte impacto de las estrategias combinadas para aumentar el beneficio de las terapias basadas en AAV que permitan el uso de dosis de vectores más bajas y por tanto más seguras para un nivel mayor de expresión de distrofina a largo plazo.

15

REFERENCIAS

1. Harper,S.Q., Hauser,M.A., DelloRusso,C., Duan,D., Crawford,R.W., Phelps,S.F., Harper,H.A., Robinson,A.S., Engelhardt,J.F., Brooks,S.V. et al. (2002) Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.*, 8, 253-261.
2. Goemans,N.M., Tulinius,M., van den Akker,J.T., Burm,B.E., Ekhardt,P.F., Heuvelmans,N., Holling,T., Janson,A.A., Platenburg,G.J., Sipkens,J.A. et al. (2011) Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.*, 364, 1513-1522.
3. Cirak,S., Arechavala-Gomez,V., Guglieri,M., Feng,L., Torelli,S., Anthony,K., Abbs,S., Garralda,M.E., Bourke,J., Wells,D.J. et al. (2011) Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet*, 378, 595-605.
4. Mendell,J.R., Rodino-Klapac,L.R., Sahenk,Z., Roush,K., Bird,L., Lowes,L.P., Alfano,L., Gomez,A.M., Lewis,S., Kota,J. et al. (2013) Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, 74, 637-647.
5. Voit,T., Topaloglu,H., Straub,V., Muntoni,F., Deconinck,N., Campion,G., de Kimpe,S.J., Eagle,M., Guglieri,M., Hood,S. et al. (2014) Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol.*, 13, 987-996.
6. Brun,C., Suter,D., Pauli,C., Dunant,P., Lochmuller,H., Burgunder,J.M., Schumperli,D. and Weis,J. (2003) U7 snRNAs induce correction of mutated dystrophin pre-mRNA by exon skipping. *Cell Mol. Life Sci.*, 60, 557-566.
7. Goyenvalle,A., Vulin,A., Fougereousse,F., Leturcq,F., Kaplan,J.C., Garcia,L. and Danos,O. (2004) Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*, 306, 1796-1799.
8. Denti,M.A., Rosa,A., D'Antona,G., Sthandier,O., De Angelis,F.G., Nicoletti,C., Allocca,M., Pansarasa,O., Parente,V., Musaro,A. et al. (2006) Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx
9. Goyenvalle,A., Babbs,A., Wright,J., Wilkins,V., Powell,D., Garcia,L. and Davies,K.E. (2012) Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum. Mol. Genet.*, 21, 2559-2571.

10. Bish,L.T., Sleeper,M.M., Forbes,S.C., Wang,B., Reynolds,C., Singletary,G.E., Trafny,D., Morine,K.J., Sanmiguel,J., Cecchini,S. et al. (2012) Long-term restoration of cardiac dystrophin expression in golden retriever muscular dystrophy following rAAV6-mediated exon skipping. *Mol. Ther.*, 20, 580-589.
11. Vulin,A., Barthelemy,I., Goyenvalle,A., Thibaud,J.L., Beley,C., Griffith,G., Benchaouir,R., Le,H.M., Unterfinger,Y., Lorain,S. et al. (2012) Muscle function recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping. *Mol. Ther.*, 20, 2120-2133.
12. Lorain,S., Gross,D.A., Goyenvalle,A., Danos,O., Davoust,J. and Garcia,L. (2008) Transient immunomodulation allows repeated injections of AAV1 and correction of muscular dystrophy in multiple muscles. *Mol. Ther.*, 16, 541-547.
13. Le Hir,M., Goyenvalle,A., Peccate,C., Precigout,G., Davies,K.E., Voit,T., Garcia,L. and Lorain,S. (2013) AAV Genome Loss From Dystrophic Mouse Muscles During AAV-U7 snRNA-mediated Exon-skipping Therapy. *Mol. Ther.*, 21, 1551-1558.
14. Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3, 285-298.
15. Reed, R., and Maniatis, T. (1988). The role of the mammalian branchpoint sequence in pre-mRNA splicing. *Genes & development* 2, 1268-1276.
16. Aartsma-Rus, A., van Vliet, L., Hirschi, M., Janson, A.A., Heemskerk, H., de Winter, C.L., de Kimpe, S., van Deutekom, J.C., t Hoen, P.A., and van Ommen, G.J. (2009). Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol Ther* 17, 548-553.
17. Brown SC, Fassati A, Popplewell L, Page AM, Henry MD, Campbell KP, Dickson G. Dystrophic phenotype induced in vitro by antibody blockade of muscle alpha-dystroglycan-laminin interaction. *J Cell Sci.* 1999 Jan;112 (Pt 2):209-16.
18. Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., Lee, S.K., Shankar, P., and Manjunath, N. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448, 39-43.
19. Betts, C., Saleh, A.F., Arzumanov, A.A., Hammond, S.M., Godfrey, C., Coursindel, T., Gait, M.J., and Wood, M.J. (2012). Pip6-PMO, A New Generation of Peptide-oligonucleotide Conjugates With Improved Cardiac Exon Skipping Activity for DMD Treatment. *Molecular therapy Nucleic acids* 1, e38.
20. Lehto,T., Castillo,A.A., Gauck,S., Gait,M.J., Coursindel,T., Wood,M.J., Lebleu,B. and Boisguerin,P. (2014) Cellular trafficking determines the exon skipping activity of Pip6a-PMO in mdx skeletal and cardiac muscle cells. *Nucleic Acids Res.*, 42, 3207-3217.

21. Yamada, T., Das Gupta, T.K., and Beattie, C.W. (2013). p28, an anionic cell-penetrating peptide, increases the activity of wild type and mutated p53 without altering its conformation. *Molecular pharmaceutics* 10, 3375-3383.
22. Malhotra, M., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Kahouli, I., and Prakash, S. (2013). Development and characterization of chitosan-PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. *International journal of nanomedicine* 8, 2041-2052.
23. Lundberg, M., Wikstrom, S., and Johansson, M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther* 8, 143-150.
24. Lu, Q.L., Mann, C.J., Lou, F., Bou-Gharios, G., Morris, G.E., Xue, S.A., Fletcher, S., Partridge, T.A. and Wilton, S.D. (2003) Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat. Med.*, 9, 1009-1014.
25. Gregorevic P, Allen JM, Minami E, Blankinship MJ, Haraguchi M, Meuse L, Finn E, Adams ME, Froehner SC, Murry CE, Chamberlain JS. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med.* 2006 Jul;12(7):787-9.
26. Koo T, Okada T, Athanasopoulos T, Foster H, Takeda S, Dickson G. Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J Gene Med.* 2011 Sep;13(9):497-506.
27. Shin JH, Pan X, Hakim CH, Yang HT, Yue Y, Zhang K, Terjung RL, Duan D. Microdystrophin ameliorates muscular dystrophy in the canine model of duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 2013 Apr;21(4):750-7
28. Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Shilling C, Lewis S, Bowles D, Gray S, Li C, Galloway G, Malik V, Coley B, Clark KR, Li J, Xiao X, Samulski J, McPhee SW, Samulski RJ, Walker CM. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2010 Oct 7;363(15):1429-37.
29. Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78, 6381-6388.
30. Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11854-11859.
31. McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8, 1248-1254.

32. Cazzella, V., Martone, J., Pinnaro, C., Santini, T., Twayana, S.S., Sthandier, O., D'Amico, A., Ricotti, V., Bertini, E., Muntoni, F., et al. (2012). Exon 45 skipping through U1-snRNA antisense molecules recovers the Dys-nNOS pathway and muscle differentiation in human DMD myoblasts. *Mol Ther* 20, 2134-2142.
33. De Angelis, F.G., Sthandier, O., Berarducci, B., Toso, S., Galluzzi, G., Ricci, E., Cossu, G., and Bozzoni, I. (2002). Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9456-9461.
34. Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.C., Garcia, L., and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796-1799.
35. Schumperli, D., and Pillai, R.S. (2004). The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell Mol Life Sci* 61, 2560-2570.
36. Duguez, S., Duddy, W., Johnston, H., Laine, J., Le Bihan, M.C., Brown, K.J., Bigot, A., Hathout, Y., Butler-Browne, G. and Partridge, T. (2013) Dystrophin deficiency leads to disturbance of LAMP1-vesicle-associated protein secretion. *Cell Mol. Life Sci.*, 70, 2159-2174.
37. Foster, H., Sharp, P.S., Athanasopoulos, T., Trollet, C., Graham, I.R., Foster, K., Wells, D.J., Dickson, G. (2008) Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 gene transfer. *Mol. Ther.*, 16, 1825-1832.
38. Bartlett, R.J., Stockinger, S., Denis, M.M., Bartlett, W.T., Inverardi, L., Le, T.T., thi Man, N., Morris, G.E., Bogan, D.J., Metcalf-Bogan, J., Kornegay, J.N. (2000) In vivo targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat. Biotechnol.*, 18, 615-622.
39. Le Hir, M., Goyenvalle, A., Peccate, C., Précigout, G., Davies, K.E., Voit, T., Garcia, L. and Lorain, S. (2013) AAV genome loss from dystrophic mouse muscles during AAV-U7 snRNA-mediated exon-skipping therapy. *Mol Ther.*, 21, 1551-1558.
40. Hoogaars, W.M., Mouisel, E., Pasternack, A., Hulmi, J.J., Relizani, K., Schuelke, M., Schirwis, E., Garcia, L., Ritvos, O., Ferry, A. and 't Hoen, P.A. (2012) Combined effect of AAV-U7-induced dystrophin exon skipping and soluble activin type IIB receptor in mdx mice. *Human gene therapy*, 23, 1269-1279.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE ET AL.
- <120> TERAPIA COMBINADA PARA LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE
- 5 <130> B2046PC00
- <160> 7
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- 15 <213> artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido antisentido
- 20 <400> 1
- ggccaaacct cggcttacct gaaat 25
- <210> 2
- <211> 44
- 25 <212> DNA
- <213> artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido antisentido modificado con U7
- 30 <400> 2
- ggccaaacct cggcttacct aaatagaagt tcattacac taac 44
- <210> 3
- <211> 22
- 35 <212> DNA
- <213> artificial
- <220>
- 40 <223> cebador
- <400> 3
- ctccatcact aggggttcct tg 2
- 45 <210> 4
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> artificial
- 50 <220>
- <223> cebador
- <400> 4
- gtagataagt agcatggc 18
- 55 <210> 5
- <211> 17
- <212> DNA

ES 2 764 460 T3

<213> artificial

<220>

<223> sonda

5 <400> 5
tagttaatga ttaaccc 17

10 <210> 6
<211> 3765
<212> DNA
<213> artificial

15 <220>
<223> delta-AB/R3-R18/delta CT optimizado

<400> 6

gccacccatgc	tgtggtggga	ggaagtggag	gactgctacg	agagagagga	cgtgcagaag	60
aaaaccttca	ccaagtgggt	gaacgcccag	ttcagcaagc	acctggaggc	ccctgaggac	120
aagagcttcg	gcagcagcct	gatggagagc	gaagtgaacc	tggacagata	ccagaccgcc	180
ctggaggaag	tgctgagctg	gctgctgagc	gccgaggaca	ccctgcaggc	ccagggcgag	240
atcagcaacg	acgtggaagt	ggtgaaggac	cagttccaca	cccacgaggg	ctacatgatg	300
gatctgaccg	cccaccaggg	cagagtgggc	aatatcctgc	agctgggcag	caagctgatc	360
ggcaccggca	agctgagcga	ggacgaggag	accgaagtgc	aggagcagat	gaacctgctg	420
aacagcagat	gggagtgcct	gagagtggcc	agcatggaga	agcagagcaa	cctgcacaga	480
gtgctgatgg	acctgcagaa	ccagaagctg	aaggagctga	acgactggct	gaccaagacc	540
gaggagcgga	ccagaaagat	ggaggaggag	cccctgggcc	ccgacctgga	ggacctgaag	600
agacaggtgc	agcagcacia	ggagaccgag	atcgccgtgc	aggccaagca	gcccgcagtg	660
gaggagatcc	tgagcaaggg	ccagcacctg	tacaaggaga	agcctgccac	ccagcccgtg	720
aagagaaagc	tggaggatct	gagcagcgag	tggaaggccg	tgaacagact	gctgcaggag	780
ctgagagcca	aacagcctga	cctggcccct	ggcctgacca	ccatcgggc	cagccccacc	840
cagacagtga	ccctggtgac	ccagcctgtg	gtgaccaagg	agacagccat	cagcaagctg	900
gagatgcccc	gctccctgat	gctggaagtg	cccgcctgg	ccgatttcaa	tagggcctgg	960
accgagctga	ccgattggct	gtccctgctg	gaccaggtga	tcaagagcca	gagagtgatg	1020
gtgggcgatc	tggaggacat	caacgagatg	atcatcaagc	agaaagccac	catgcaggac	1080
ctggagcaga	ggagaccccc	gctggaagag	ctgatcacag	ccgcccagaa	cctgaagaac	1140
aagaccagca	accaggaggc	caggaccatc	atcaccgacc	ggatcgagag	gatccagaac	1200
cagtgggatg	aagtgcagga	acacctgcag	aacagacggc	agcagctgaa	cgagatgctg	1260
aaggacagca	cccagtggct	ggaggccaag	gaggaggccg	agcaggtgct	gggccaggcc	1320
agagccaagc	tggagtccctg	gaaggagggc	ccttacaccg	tggatgccat	ccagaagaag	1380

ES 2 764 460 T3

atcaccgaga ccaagcagct ggccaaggac ctgagacagt ggcagaccaa cgtggacgtg 1440
 gccaatgatc tggccctgaa gctgctgaga gactacagcg ccgacgatac ccgaaaagtg 1500
 cacatgatca cagagaacat caatgcttct tggcggagca tccacaagag agtgagcgag 1560
 agagaagccg ccctggaaga gactcatagg ctgctccagc agttccctct ggacctggag 1620
 aagttcctgg cctggctgac agaggccgag accaccgcca acgtgctgca ggacgccacc 1680
 agaaaggaga gactgctgga ggatagcaag ggcgtaagg aactgatgaa gcagtggcag 1740
 gatctgcagg gcgaaatcga ggcccacacc gacgtgtacc acaacctgga cgagaacagc 1800
 cagaagatcc tgagaagcct ggagggcagc gacgacgccg tgctgctgca gagaaggctg 1860
 gacaacatga acttcaagtg gagcgagctg cggaagaaga gcctgaacat ccggagccac 1920
 ctggaagcca gcagcgacca gtggaagaga ctgcacctga gcctgcagga actgctggtg 1980
 tggctgcagc tgaaggacga cgagctgagc agacaggccc ccatcgggcg cgacttcccc 2040
 gccctgcaga agcagaacga cgtgcaccgg gccttcaaga gggagctgaa aaccaaggaa 2100
 cccctgatca tgagcaccct ggagacagtg cggatcttcc tgaccgagca gcccctggag 2160
 ggcttgaga agctgtacca ggagcccaga gagctgcccc ccgaggagag agcccagaac 2220
 gtgacccggc tgctgagaaa gcagccgag gaagtgaata ccgagtggga gaagctgaat 2280
 ctgcactccg ccgactggca gaaaagatc gacgagacc tggaacgcct gcaggagctg 2340
 caggaagcca ccgacgagct ggacctgaaa ctgaggcagc ccgaagtgat caagggcagc 2400
 tggcagcctg tggggcacct gctgatogat tccttgcagc accacctgga aaaagtgaag 2460
 gccctcaggg gcgagatcgc tccttgaag gagaatgtga gccacgtgaa cgacctggcc 2520
 agacagctga ccacctggg catccagctg agcccctaca acctgagcac actggaagat 2580
 ctgaacaccc ggtggaagct gctgcaggtg gccgtggagg atagagtgag gcagctgcac 2640
 gaagcccaca gagacttcgg ccctgccagc cagcacttcc tgagcaccag cgtgcagggc 2700
 ccctgggaga gagccatctc ccccaacaaa gtgccctact acatcaacca cgagaccag 2760
 accacctgct gggaccaccc taagatgacc gagctgtatc agagcctggc cgacctgaac 2820
 aatgtcgggt tcagcgccta cagaaccgcc atgaagctgc ggagactgca gaaggccctg 2880
 tgcctggacc tgctgagcct gagcggcggc tgcgacggc tggaccagca caacctgaag 2940
 cagaatgacc agccatgga catcctgcag atcatcaact gcctgaccac aatctacgat 3000
 cggctggagc aggagcacia caacctggtg aacgtgcccc tgtgctgga catgtgcctg 3060
 aattggctgc tgaacgtgta cgacaccggc aggaccggca gaatcagagt gctgtccttc 3120
 aagaccggca tcatcagcct gtgcaaggcc cacctggagg ataagtaccg ctacctgttc 3180
 aagcaggtgg ccagcagcac cggcttctgc gatcagagga gactgggcct gctgctgcac 3240

ES 2 764 460 T3

gatagcatcc agatccctag gcagctgggc gaagtggcca gctttggcgg cagcaacatc 3300
gagccctctg tgaggagctg cttccagttc gccacaaca agcccgagat cgaggccgcc 3360
ctgttcctgg attggatgag gctggagccc cagagcatgg tgtggctgcc tgtgctgcac 3420
agagtggccg ccgccgagac cgccaagcac caggccaagt gcaacatctg caaggagtgc 3480
cccatcatcg gcttccggta caggagcctg aagcacttca actacgacat ctgccagagc 3540
tgctttttca gcggcagagt ggccaagggc cacaagatgc actaccccat ggtggagtac 3600
tgcacccccca ccacctccgg cgaggatgtg agagacttcg ccaaagtgct gaagaataag 3660
ttccggacca agcggactct tgccaagcac cccaggatgg gctacctgcc cgtgcagacc 3720
gtgctggagg gcgacaacat ggagaccgac accatgtgat gatga 3765

<210> 7
<211> 3606
5 <212> DNA
<213> artificial

<220>
10 <223> delta R4-R23/delta CT optimizado

<400> 7
gccaccatgc tgtggtggga ggaagtggag gactgctacg agagagagga cgtgcagaag 60
aaaaccttca ccaagtgggt gaacgcccag ttcagcaagt tcggcaagca gcacatcgag 120
aacctgttca gcgacctgca ggatggcagg agactgctgg atctgctgga gggactgacc 180
ggccagaagc tgcccaagga gaagggcagc accagagtgc acgccctgaa caactgaa 240
aaggccctga gagtgctgca gaacaacaac gtggacctgg tgaatatcgg cagcaccgac 300
atcgtggacg gcaaccacaa gctgacctg ggctgatct ggaacatcat cctgcaactg 360
caggtgaaga acgtgatgaa gaacatcatg gccggcctgc agcagaccaa cagcgagaag 420
atcctgctga gctgggtgag gcagagcacc agaaactacc cccaggtgaa cgtgatcaac 480
ttcaccacct cctggagcga cggcctggcc ctgaacgccc tgatccacag ccacagacc 540
gacctgttcg actggaacag cgtggtgtgt cagcagagcg ccaccagag actggagcac 600
gccttcaaca tcgccagata ccagctgggc atcgagaagc tgctggaccc cgaggacgtg 660
gacaccacct accccgacaa gaaaagcatc ctgatgtata ttacctctct gtttcaggtg 720
ctgccccagc agtgtccat cgaggccatc caggaagtgg aatgctgcc caggccccc 780
aaagtgacca aggaggagca cttccagctg caccaccaga tgcactatag ccagcagatc 840
accgtgtccc tggcccaggg ctatgagaga accagcagcc ccaagcccag attcaagagc 900
tacgcctaca cccaggccgc ctacgtgacc acctccgacc ccaccagaag ccccttcccc 960
agccagcacc tggaggcccc cgaggacaag agcttcggca gcagcctgat ggagagcgaa 1020
gtgaacctgg acagatacca gaccgccctg gaggaagtgc tgtcttggt gctgtccgcc 1080

ES 2 764 460 T3

gaggacaccc tgcaggccca gggcgagatc agcaacgacg tggaaagtgg gaaggaccag 1140
ttccacaccc acgagggcta catgatggat ctgaccgccc accagggcag agtgggcaat 1200
atcctgcagc tgggcagcaa gctgatcggc accggcaagc tgagcgagga cgaggagacc 1260
gaagtgcagg agcagatgaa cctgctgaac agcagatggg agtgcctgag agtggccagc 1320
atggagaagc agagcaacct gcaccgctg ctgatggacc tgcagaacca gaagctgaag 1380
gagctgaacg actggctgac caagaccgag gagcggacca gaaagatgga ggaggagccc 1440
ctgggccccg acctggagga cctgaagaga caggtgcagc agcacaaagt gctgcaggag 1500
gacctggaac aggagcaggt ggcgctgaac agcctgaccc acatggtggc cgtggtggac 1560
gagagcagcg gcgaccacgc cacagccgcc ctggaagagc agctgaaagt gctgggcgac 1620
agatgggcca acatctgccg gtggaccgag gacagatggg tgctgctgca ggacatcctg 1680
ctgaagtggc agagactgac agaggagcag tgcctgttta ggcctggct gagcgagaag 1740
gaggacgccc tgaacaagat ccacaccacc ggcttcaagg accagaacga gatgctgagc 1800
agcctgcaga agctggccgt gctgaaggcc gatctggaga agaaaagca gagcatgggc 1860
aagctgtact ccctgaagca ggacctgctg tccaccctga agaacaagag cgtgaccag 1920
aaaaccgagg cctggctgga caatttcgcc cgggtgctggg acaatctggt gcagaaactg 1980
gagaagagca ccgccagat cagccaggcc gtgaccacca cccagcccag cctgacacag 2040
accaccgtga tggagaccgt gaccacagtg accaccaggg agcagatcct ggtgaagcac 2100
gcccagaggg agctgcccc tccccccct cagaagaagc ggcagatcac agtggacacc 2160
ctggagagac tgcaggagct gcaggaagcc accgacgagc tggacctgaa gctgagacag 2220
gccgaagtga tcaagggcag ctggcagcct gtgggagatc tgctgatcga cagcctgcag 2280
gaccacctgg agaaagtgaa ggcctgctgg ggcgagatcg cccccctgaa ggagaatgtg 2340
agccacgtga acgacctggc cagacagctg accaccctgg gcatccagct gagcccctac 2400
aatctgagca ccctggaaga tctgaacacc cgggtgaaac tgctgcaggt ggccgtggag 2460
gatagagtga ggcagctgca cgaggcccac agagacttcg gccctgcctc ccagcacttc 2520
ctgagcacca gcgtgcaggg cccctgggag agagccatct cccccaaca agtgcctac 2580
tacetcaacc acgagacca gaccacctgc tgggaccacc ctaagatgac cgagctgtac 2640
cagagcctgg ccgacctgaa caatgtgctg ttcagcgcct acagaaccgc catgaagctg 2700
cggagactgc agaaggccct gtgcctggac ctgctgagcc tgagcgccgc ctgagcagcc 2760
ctggaccagc acaacctgaa gcagaacgac cagcccatgg acattctgca gatcatcaac 2820
tgcctgacca ccatctacga tcggctggag caggagcaca acaacctggt gaacgtgccc 2880
ctgtgcctgg acatgtgcct gaattggctg ctgaacgtgt acgacaccgg caggaccggc 2940

ES 2 764 460 T3

agaatcagag tgctgtcctt caagaccggc atcatcagcc tgtgcaaggc ccacctggag	3000
gataagtacc gctacctggt caagcaggtg gccagcagca cgggcttctg cgatcagagg	3060
agactggggc tgctgctgca cgatagcatc cagatcccta ggcagctggg cgaagtggcc	3120
agctttggcg gcagcaacat cgagccctct gtgaggagct gcttccagtt cgccaacaac	3180
aagcccgaga tcgaggccgc cctgttcctg gattggatga ggctggagcc ccagagcatg	3240
gtgtggctgc ctgtgctgca cagagtggcc gccgccgaga ccgccaagca ccaggccaag	3300
tgcaacatct gcaaggagtg ccccatcatc ggcttccggt acaggagcct gaagcacttc	3360
aactacgaca tctgccagag ctgctttttc agcggcagag tggccaaggg ccacaagatg	3420
cactaccca tggaggagta ctgcaccccc accacctccg gcgaggatgt gagagacttc	3480
gccaaagtgc tgaagaataa gttccggacc aagcggact ttgccaagca cccaggatg	3540
ggctacctgc ccgtgcagac cgtgctggag ggcgacaaca tggagaccga caccatgtga	3600
tgatga	3606

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido antisentido aislado (AON) capaz de inducir un salto de exones en un pre-mRNA de distrofina, para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne en combinación con un vector viral que codifica un producto terapéutico de la distrofia muscular de Duchenne, en donde dicho tratamiento comprende administrar dicho oligonucleótido antes de administrar dicho vector viral.
2. Un AON aislado capaz de inducir un salto de exones en un pre-mRNA de distrofina, para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, en donde dicho AON se administra como un pretratamiento antes de la administración a un paciente que se encuentra en necesidad de ello de un vector viral terapéutico de la distrofia muscular de Duchenne.
- 10 3. El AON aislado para uso conforme a la reivindicación 1 ó 2, en donde el vector viral es un vector viral que (i) o bien codifica un oligonucleótido antisentido capaz de inducir salto de exones en un pre-mRNA de distrofina, o bien (ii) codifica medios de edición del gen de distrofina, o (iii) codifica una proteína distrofina funcional.
4. El AON aislado para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el vector viral es un vector de AAV.
- 15 5. El AON aislado para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho AON es un oligómero fosfordiamidato-morfolino.
6. El AON aislado para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho AON es un oligómero péptido-fosfordiamidato-morfolino.
- 20 7. El AON aislado para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho AON es un oligómero Pip6a-PMO.
8. El AON aislado para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho vector viral codifica un U7-AON.
9. El AON aislado para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho vector viral codifica una distrofina funcional truncada tal como una mini- o micro-distrofina.
- 25 10. Un kit que comprende:
(i) un AON aislado capaz de inducir un salto de exones en un pre-mRNA de distrofina; y
(ii) un vector viral terapéutico de la distrofia muscular de Duchenne.
11. El kit conforme a la reivindicación 10, en donde el vector viral
- codifica un oligonucleótido antisentido capaz de inducir salto de exones en un pre-mRNA de distrofina; y
30 - codifica un medio de edición del gen de distrofina; o
- codifica una proteína distrofina funcional.

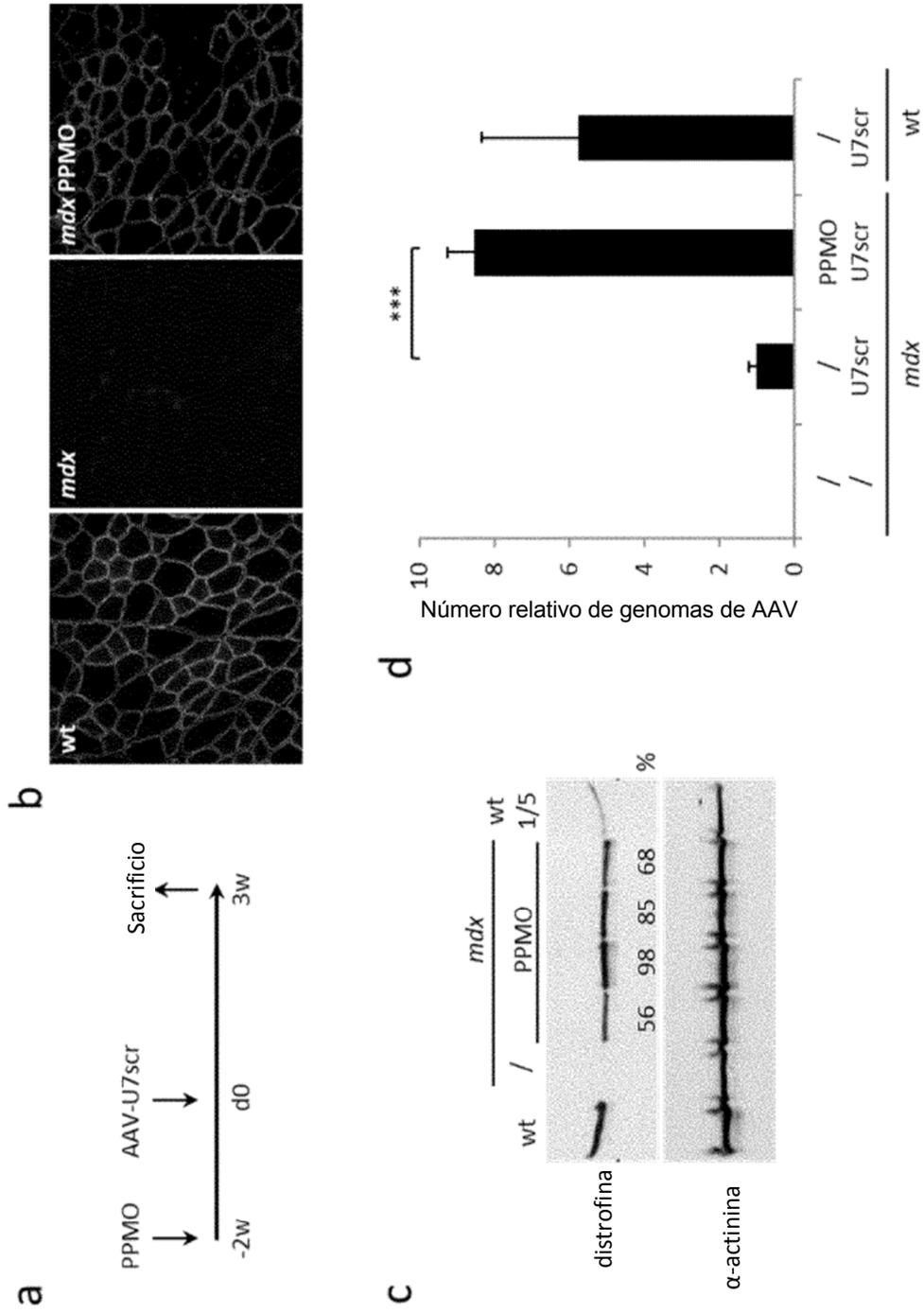


Figura 1

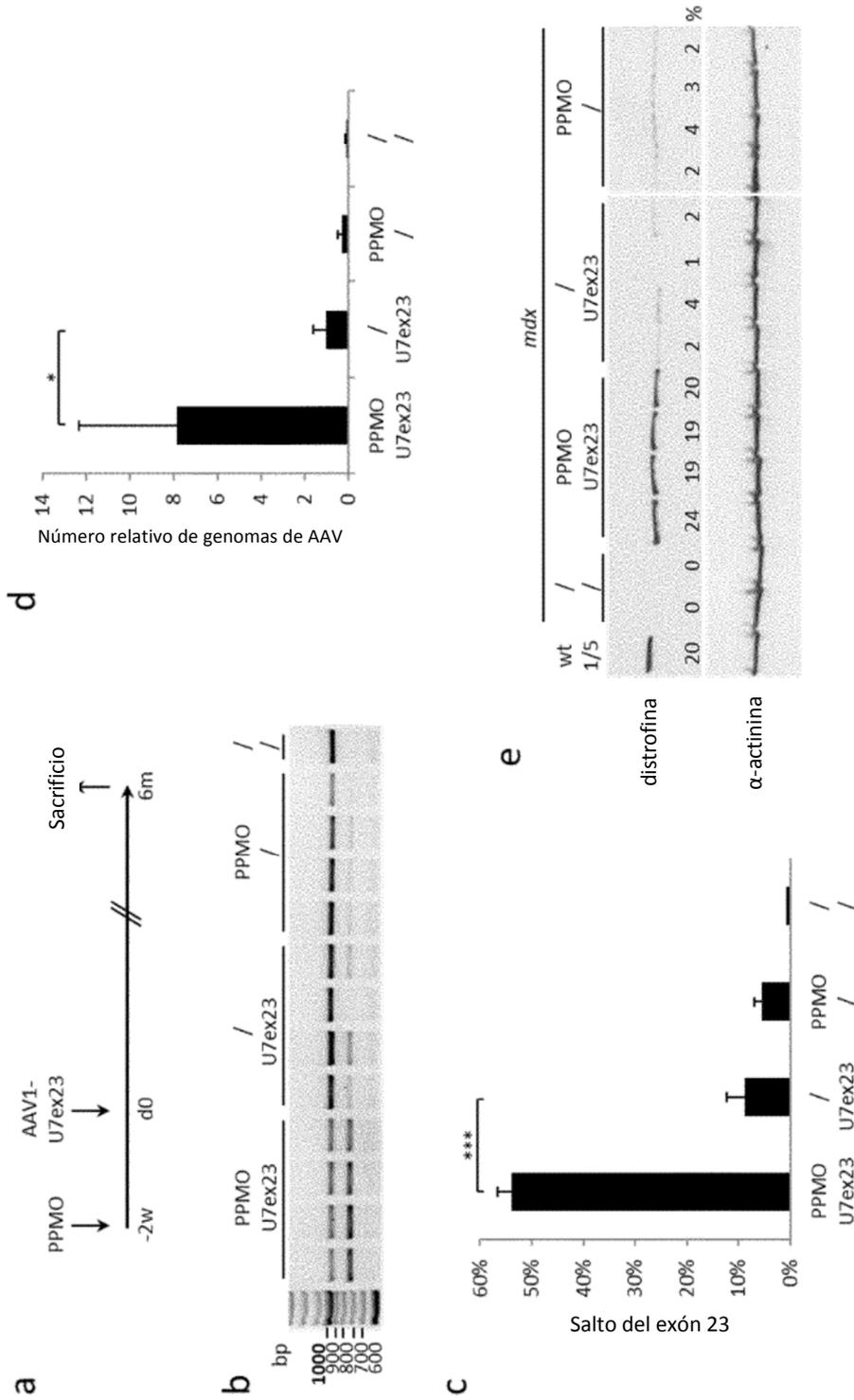


Figura 2

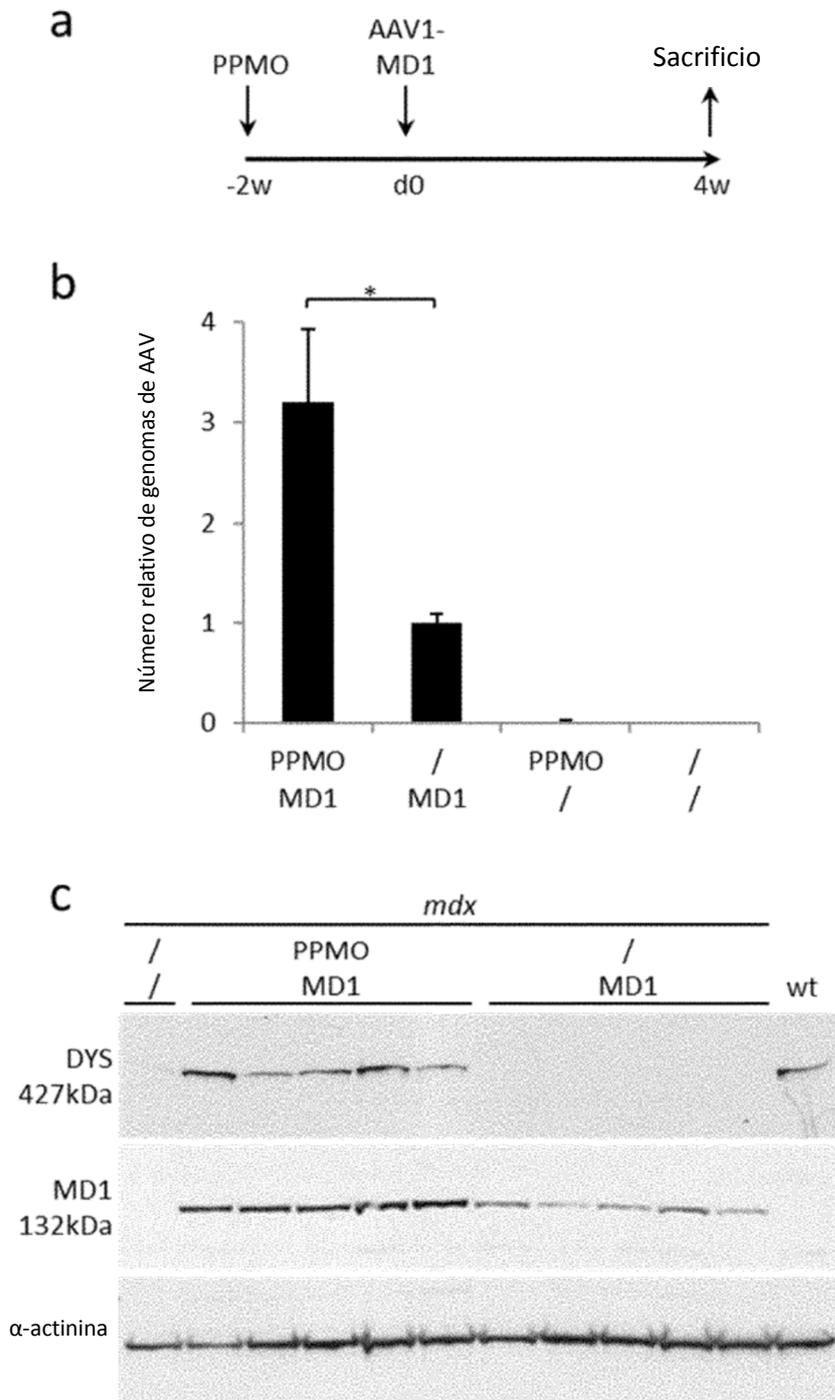


Figura 3