



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 909**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03749984 .5**
96 Fecha de presentación : **06.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1501931**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2005**

54 Título: **Moléculas de ARNs quiméricas que transportan secuencias antisentido contra las uniones por corte y empalme del gen de la distrofina y sus aplicaciones terapéuticas.**

30 Prioridad: **08.05.2002 IT RM02A0253**

73 Titular/es:
Universita' Degli Studi di Roma "La Sapienza"
Piazzale Aldo Moro 5
00185 Roma, IT

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2010

72 Inventor/es: **Bozzoni, I. y**
De Angelis, F.G.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2010

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

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

Moléculas de ARNsn quiméricas que transportan secuencias antisentido contra las uniones por corte y empalme del gen de la distrofina y sus aplicaciones terapéuticas.

La presente invención se refiere a moléculas de sn-ARN quiméricas que transportan secuencias antisentido contra las uniones por corte y empalme del gen de la distrofina y a sus aplicaciones terapéuticas. En particular, la presente invención se refiere a moléculas quiméricas capaces de enmascarar las uniones por corte y empalme de los exones mutados, induciendo de este modo su omisión del ARNm maduro. A continuación, el transcrito resultante producirá una proteína distrofina más corta, pero funcional, estas moléculas se pueden utilizar en la terapia génica de muchas formas de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

La DMD es un trastorno recesivo unido a X que afecta a 1 de cada 3500 hombres. Se caracteriza por la ausencia de la distrofina citoesquelética (proteína de 427 kDa) que, a su vez, produce un deterioro muscular severo y progresivo. La mayoría de las mutaciones de la DMD consisten en deleciones y mutaciones puntuales en el gen de la distrofina de 2,5 Mb que introducen codones de parada y mutaciones en el gen de distrofina de 2,5 Mb que introducen codones de parada y, consecuentemente, la terminación prematura de la traducción. En una forma más leve de miopatía, la Distrofia Muscular de Becker (BMD), deleciones en el gen producen ARNm en el marco de lectura y, consecuentemente, proteínas distrofina (1) más cortas, pero funcionales. Dado que un tercio de los casos de DMD son resultantes de una nueva mutación (2, 3), la enfermedad nunca se puede erradicar mediante cribado ("screening") y asesoramiento genético. La necesidad de desarrollar estrategias de tratamiento para este trastorno es evidente. Una implica el transplante de mioblastos normales en tejidos musculares que carecen de esta proteína (4, 5), mientras que otras intentan resolver la expresión correcta de distrofina mediante una estrategia de terapia génica que libera copias de ADNc de longitud completa o mini ADNc de distrofina en células que presentan el gen mutado (6-8). Aunque esta estrategia es muy prometedora, aún permanecen varios problemas sin resolver, tales como la capacidad de tamaño y la actividad transductora del vector y la respuesta inmune al gen "terapéutico" (9).

Otra estrategia de terapia génica se basa en el hecho de que las deleciones internas en el marco de lectura en la proteína producen solamente síntomas miopáticos leves; por tanto, debería ser posible, evitando la inclusión de un exón o exones mutados específicos en el ARNm maduro de la distrofina, para restablecer un fenotipo parcialmente corregido. En este aspecto, es interesante indicar que el restablecimiento de los niveles de distrofina en niveles tan bajos como del 30% es suficiente para un beneficio terapéutico sustancial (10).

Se ha llevado a cabo una omisión específica de exón mediante la liberación extracelular de oligonucleótidos antisentido sintéticos con 2'-O-metilo desarrollados contra uniones por corte y empalme ("splice junctions") específicas (11-13) o potenciadores exónicos (10). La interacción del ARN antisentido con la correspondiente secuencia diana debería enmascarar la utilización de sitios de corte y empalme específicos o evitar la unión de factores potenciadores durante la reacción de corte y empalme y determinar la omisión del exón o exones mutados vecinos para producir un ARNm de distrofina en el marco de lectura, siendo el efecto final la producción de una proteína distrofina más corta, pero funcional. Una desventaja significativa para la estrategia con oligonucleótidos sintéticos es que requeriría administraciones periódicas.

Para sortear este problema, los autores de la presente invención han desarrollado vectores capaces de expresar *in vivo*, de una manera estable y continua, grandes cantidades de ARN quiméricos que contienen secuencias antisentido. Esta estrategia se ensayó sobre la deleción humana de los exones 48-50, pero los expertos lo podrían aplicar también a otros exones del gen de la distrofina. En este caso, se produce un codón de terminación prematura en el exón 51; si se obtiene la omisión de este exón, el resultado sería un ARNm en el marco de lectura.

Las secuencias antisentido clonadas en los vectores de ARNsn se pueden diseñar para emparejarse con cualquier región de un transcrito celular. En principio, si existen secuencias que deben ser reconocidas por maquinarias celulares específicas, su enmascaramiento por ARN antisentido debería interferir con procesos específicos.

Dado que los ARNsn se localizan en el núcleo, sólo pueden afectar a procesos nucleares.

Los ARN antisentido puede afectar en el corte y empalme mediante la interacción con dos tipos de secuencias:

- a) *sitios de corte y empalme*: Los ARN contra sitios de corte y empalme pueden inducir, durante el corte y empalme, la omisión de un exón específico.
- b) *potenciadores de corte y empalme*: Muchos exones humanos, de tamaño grande o con sitios de corte y empalme flanqueantes relativamente débiles, contienen secuencias que promueven su utilización, el denominado potenciador de corte y empalme exónico (ESE). Dichas secuencias son reconocidas por proteínas ricas en serina/arginina (SR) que promueven la utilización de exones en tejidos en los que se expresan. Se pueden diseñar ARN antisentido que obstaculizan dichos potenciadores de corte y empalme, de manera que se omite el exón y no se incluye en el ARNm maduro. Con respecto al reconocimiento de las secuencias en los sitios de corte y empalme 3' y 5' que pueden causar menos omisiones predecibles de exones adyacentes adicionales, la eliminación de potenciadores exónicos produce un efecto muy específico y más reproducible sólo en los intrones flanqueantes.

El reconocimiento de sitios de corte y empalme o potenciadores exónicos se puede aplicar en todos los casos en los que la omisión de un exón mutado específico puede restablecer la funcionalidad del ARNm (tal como en el caso de las mutaciones de la distrofina).

Dado que más de la mitad de los genes humanos codifican transcritos que experimentan cortes y empalmes alternativos, los métodos generales para controlar la expresión de isoformas concretas por corte y empalme alternativo de genes específicos sería útil en una amplia variedad de aplicaciones. Los ARN antisentido contra uniones específicas de corte y empalme pueden controlar el tipo de ARNm producido por corte y empalme alternativo y de la correspondiente proteína.

Los ARN antisentido también se pueden aplicar para interferir con los siguientes procesos:

1) Formación del extremo 3' de los ARNm. Este proceso requiere un aparato complejo de proteínas que mediante el reconocimiento de secuencias conservadas específicas presentes en la 3'UTR determina la escisión del transcrito naciente y la adición de la cola de poliA. El enmascaramiento de las secuencias reconocidas por los componentes de la escisión/poliadenilación o el sitio de escisión debería evitar la formación del extremo 3', produciendo de este modo la ultralectura a las secuencias en dirección 3'. Los ARN de la ultralectura son conducidos rápidamente al mecanismo degradativo, ya que carecen de la cola de poliA. La estrategia antisentido en este caso debería disminuir significativamente la abundancia de un ARNm específico. Esta estrategia también es útil en aquellos casos en los que están presentes sitios alternativos de escisión/poliadenilación en el mismo gen. La omisión de uno de los sitios alternativos puede controlar el tipo de transcrito producido.

2) Edición.

La edición de ARN es un proceso nuclear posterior a la transcripción que consiste en la modificación específica de sitio del ARNm. Factores específicos, que interaccionan con el ARN, son responsables de dichas modificaciones. Además, en este caso, el enmascaramiento del sustrato debería evitar que tuviera lugar la edición, alterando de este modo la capacidad codificante del ARNm.

A efectos de obtener moléculas de ARN "terapéuticas" eficaces *in vivo*, se consideraron varios parámetros importantes. No sólo deben clonarse los genes para estos ARN bajo promotores eficaces que producen niveles elevados de expresión, sino que, además, el contexto del ARN en el que se encuentra el ARN terapéutico debe proporcionar estabilidad y una localización subcelular específica. El último punto es crucial, ya que los ARN de las células se organizan en localizaciones celulares específicas (núcleo, nucleolo, citoplasma, RNP libres y unidos a polisomas, etc.) y se puede obtener una actividad eficaz de la molécula terapéutica sólo si se asegura la localización simultánea con la diana (15, 33, 34). Se han utilizado de forma ventajosa pequeños ARN celulares como vectores, ya que normalmente se transcriben a partir de promotores fuertes (pIII o pIII) y porque permiten la liberación de construcciones quiméricas en compartimentos celulares específicos (15, 26, 30, 32, 33).

Los autores han utilizado diferentes ARN nucleares pequeños y sus correspondientes genes a efectos de expresar en el núcleo moléculas quiméricas que transportan secuencias antisentido complementarias de las uniones por corte y empalme del exón 51 y se ha analizado su actividad en mioblastos de pacientes con DMD con la delección de los exones 48-50. La unión por corte y empalme es una región a lo largo del sitio de corte y empalme y comprende las secuencias en dirección 5' y 3' desde el sitio. Los resultados obtenidos mostraron que la combinación de moléculas antisentido contra las uniones por corte y empalme en 5' y 3' inducía la omisión eficaz del exón 51 y el rescate parcial de la síntesis de distrofina. La elección de los ARN portadores fue impuesta por la posibilidad de localizar simultáneamente las moléculas antisentido con su ARN diana. Dos de los ARN seleccionados, U1 y U2, son conocidos por participar en la reacción de corte y empalme, incrementando de este modo la probabilidad de que la molécula antisentido se libere al compartimento en el que se localiza el pre-ARNm de la distrofina. En esta técnica, el ARNs U7 nucleoplásmico se utilizó previamente para expresar moléculas antisentido *in vivo* y para dirigir la omisión del exón de un gen de beta-globina mutante (32). Sin embargo, se conoce que el promotor del gen para ARNs U7 es menos activo (17, 35, 36). Los autores de la presente invención han seleccionado, en cambio, los ARN U1 y U2, ya que dirigen las moléculas antisentido específica y selectivamente en el compartimento de corte y empalme, mejorando de este modo la localización simultánea con la molécula diana. Además, los vectores de la presente invención alcanzan ambos sitios de corte y empalme en 5' y 3'. Finalmente, el gen de globina representa un sistema de expresión y síntesis que difiere del de la distrofina.

El análisis de las líneas celulares derivadas de un paciente distrófico, immortalizadas con un SV40 con T grande, y transducidas de manera estable con vectores retrovirales que transportan las construcciones diferentes, indica que la omisión eficaz se obtiene cuando dos moléculas antisentido específicas para las uniones por corte y empalme en 5' y 3' del exón 51 se expresan simultáneamente en la misma célula. Se observa un efecto menor cuando se utilizan moléculas antisentido de cadena sencilla. En aquellas células en las que se observa la omisión del exón 51, se obtiene el rescate de la síntesis de distrofina.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es dar a conocer un gen que codifica un ARNs U1 humano modificado en el que el fragmento del gen U1 5' que transcribe la región U1 que es de cadena sencilla comprende una secuencia antisentido complementaria a las uniones de corte y empalme en 5' y 3' de, como mínimo, una secuencia

de exón del pre-ARNm de la distrofina, de manera que se omite, como mínimo, una secuencia de exón del pre-ARNm de la distrofina durante el proceso de corte y empalme que convierte el pre-ARNm en el ARNm maduro.

Preferentemente, el ARNsn U1 modificado se modifica adicionalmente, de manera que se elimina el fragmento del gen U1 que transcribe la secuencia de ARN que interacciona con la proteína de 70 k asociada a U1.

En la presente invención, se puede omitir, como mínimo, el exón 51 del pre-ARNm de la distrofina.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un ARNsn U1 humano modificado transcrito por el gen de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un vector para la expresión estable y eficaz en células diana que expresan la distrofina transcribiendo el ARNsn U1 humano modificado tal como se ha descrito anteriormente. El vector puede ser un vector retroviral, adenoviral o viral adeno-asociado. Preferentemente, el vector es adecuado para una transferencia a células madre o a células de fibras musculares.

La presente invención también da a conocer un gen, un ARNsn U1 humano modificado o un vector de la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente, para la utilización en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

La presente invención también da a conocer un gen, un ARNsn U1 humano modificado o un vector según la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente, para la utilización en el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne.

La presente invención da a conocer además la utilización de un gen, un ARNsn U1 humano modificado o un vector según la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente, en la fabricación de un medicamento para su utilización en el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne.

Los segmentos del vector capaces de asegurar la expresión estable y eficaz del gen para el ARNsn modificado según el método de la presente invención serán seleccionados por un experto en la materia según la célula diana. Si las células de fibras musculares son la diana, comprenden partes retrovirales, adenovirales, adeno-asociadas, lentivirales, etc.

De forma ventajosa, en comparación con la técnica anterior que utiliza oligonucleótidos antisentido, la omisión del exón mutado y el restablecimiento de la síntesis de distrofina son características que las células transducidas adquieren permanentemente, evitando de este modo la necesidad de una administración continua para conseguir un efecto terapéutico. Por lo tanto, los vectores de la presente invención representan una herramienta para el desarrollo de estrategias para la liberación *in vivo* de ARN terapéuticos, mediante el diseño de ARN antisentido en los vectores que se traducen de manera eficaz en células de fibras musculares, como, por ejemplo, los vectores derivados de retrovirus, tales como lentivirus, adenovirus o adeno-asociados.

La presente invención se describe a continuación en relación a ejemplos experimentales no limitantes y en referencia a las siguientes figuras:

Figura 1. Representación esquemática de la mutación de distrofina utilizada en este estudio. El paciente 491 A presenta una delección que comprende del exón 48 al 50. Parte superior: se muestra el corte y empalme del pre-ARNm transcrito de este gen mutante (los exones se representan mediante cuadros y los intrones mediante líneas): se produce un ARNm fuera del marco de lectura con un codón de parada en el exón 51. Derecha: la delección del exón 51 del ARNm produce un ARNm funcional que codifica para una proteína más corta de 217 aminoácidos. Los ARN antisentido dirigidos contra las uniones por corte y empalme del exón 51 también se representan esquemáticamente con respecto a su sustrato diana. Panel A) Se obtuvo la construcción U1-5' mediante la sustitución de la región complementaria a las uniones por corte y empalme en 5' (nucleótidos encuadrados) con una secuencia antisentido contra la unión por corte y empalme en 5' del exón 51. Panel B) Estructura de los derivados U2. El ARNsn U2 se convirtió inicialmente en la construcción U2mod que, a su vez, se modificó para obtener U2BP. La secuencia de la parte 5' de los derivados de ARNsn de tipo salvaje y U2 (nucleótidos 1-52) se muestra en el panel superior junto con la de los nucleótidos complementarios de ARNsn U6. Las regiones encuadradas indican las sustituciones de nucleótidos introducidos, mientras que el emparejamiento con U6 se indica mediante líneas verticales. La región larga U2 de 14 nucleótidos, indicados en cursiva, que contienen la región de emparejamiento en el punto de ramificación, se eliminó en U2 mod. En U2BP, esta región se sustituyó por una secuencia larga de 28 nucleótidos complementaria a la región 3' que contiene el punto de ramificación del intrón 50 (subrayado). Las modificaciones U2 mod se realizaron para mantener la estructura secundaria global (véase la representación esquemática en el panel inferior), evitando el emparejamiento con el ARNsn U6.

Figura 2. Expresión *in vivo* de las construcciones antisentido. Se separaron en geles de poliacrilamida al 6%/urea 7 M 8 microgramos de ARN total, extraídos de poblaciones de células mixtas transducidas con los diferentes vectores pBabe quiméricos (indicados por encima de las calles) y de células no transducidas de control (calles 491A), y se electrotransfirieron sobre membranas de nylon. Se llevaron a cabo hibridaciones con oligonucleótidos marcados con ³²P específicos para cada ARN antisentido, tal como se indica debajo de cada panel. Calle M: marcador de peso molecular (ADN plasmídico pBR322, digerido con MspI).

Figura 3. Efecto de la construcción antisentido U2 en el corte y empalme. Se inyectaron ovocitos con plásmidos que contenían U2h o U2-BP, tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Se aislaron manualmente los núcleos de ovocitos individuales y se extrajo el ARN. Se separaron las muestras en geles de poliacrilamida al 6%/urea 7 M y se transfirieron. La autorradiografía directa del filtro muestra ARN marcados con ³²P (Panel A), mientras que las hibridaciones que contienen sondas específicas permiten el análisis de la expresión de los plásmidos inyectados (Paneles B y C). En B) se utilizó una sonda antisentido específica y en C) una sonda para el ARNsn U2. El ARNsn U2h se acumula en los ovocitos principalmente como un precursor algunos nucleótidos más largo (banda U2h). Los productos de corte y empalme diferentes se muestran en la parte lateral. Calle M: pBR322 digerido con MspI.

Figura 4: Análisis de los efectos de la construcción antisentido sobre el patrón de corte y empalme del ARNm de la distrofina. La parte superior de los paneles muestra los oligonucleótidos utilizados para las reacciones RT-PCR anidadas en el pre-ARNm de la distrofina 491A. La RT-PCR se realizó con los oligonucleótidos externos; después de 40 ciclos de amplificación, se realizó la PCR anidada con los internos. Los productos de amplificación de líneas celulares no tratadas (calles 491 A) y transducidas (el nombre de la construcción antisentido específica se indica encima de cada calle) se separaron en geles de agarosa al 2% en paralelo con control menos ARN (calles-) y con los productos de amplificación obtenidos en ARN de una línea celular de músculo esquelético de tipo salvaje (calle SMC). El producto de amplificación de 501 nucleótidos de largo corresponde al ARN 491A no omitido, mientras que el fragmento de 268 nucleótidos de largo corresponde al ARNm omitido. En la calle SMC, el producto de amplificación de 898 nucleótidos tiene el tamaño esperado para un ARNm de la distrofina de tipo salvaje. Calle M: escalera de ADN de 100 pb (Invitrogen).

Figura 5. Análisis de los efectos de construcciones dobles antisentido en el patrón de corte y empalme del ARNm de la distrofina. Panel A): representación esquemática de construcción retroviral pBabe puro. Los cassettes de expresión antisentido se clonaron de cabeza a cola en la LTR 3' y orientación directa. El vector 5'/BP contiene las construcciones U2BP y U1-5'. Panel B): Se realizó un análisis por transferencia Northern sobre 8 microgramos de ARN total extraído de células 491A no transducidas (calles 491A) o transducidas con el vector 5'/BP (calle: 5'/BP). La hibridación se llevó a cabo con oligonucleótidos marcados con ³²P indicados a continuación. Calle M: marcador del peso molecular (ADN plasmídico de pBR322, digerido con MspI). Panel C): Se llevó a cabo una RT-PCR anidada sobre ARN de células de control no transducidas (calle 491A) y de células transducidas con la construcción doble 5'/BP. Se llevó a cabo una amplificación de control en ausencia de ARN (calle -). Calle M: escalera de ADN de 100 pb (Invitrogen). Se muestra una representación esquemática de los productos sin omisión y con omisión en la parte lateral del gel. En la parte inferior del panel, la secuencia de los productos RT-PCR más cortos muestra la omisión exacta del exón 51.

Figura 6. Análisis por transferencia Western. Se separaron en gel de poliacrilamida al 6%/SDS 100 microgramos de proteínas totales extraídas de células 491A no transducidas (calles 491A) o transducidas con el vector 5'/BP, en paralelo con proteínas extraídas de células de músculo esquelético de tipo salvaje (calle SMC). El tamaño de la proteína distrofina se indica en la parte lateral.

Materiales y métodos

Construcciones de plásmidos

Se obtuvo el clon U1-5' mediante PCR inversa en el plásmido pHU1-D, que contenía todo el gen humano de ARN U1, con los oligonucleótidos:

ANTI 24+2A, 5'-GTATGAGAAAAAATGAGATCTTGGGCCTCTGC-3';

ANTI 24+2B 5'-CTTCTGCTTGATGGCAGGGGAGATACCATGATC-3'.

El cassette de expresión U1 se construyó mediante PCR inversa con los oligonucleótidos:

U1 cas A, 5'-CCTGGTACCATGAGATCTTGGGCCTCTGC-3';

U1 cas B, 5'-CCTCTCGAGCTGACTTTCTGGAGTTTC-3'.

En esta construcción, la región codificante de ARNsn U1 (de los nucleótidos 3 a 161) se sustituyó con los sitios de restricción KpnI, StuI y Xho.

El gen de ARNsn U2 humano (figura 1B), que incluye el promotor y la secuencia en dirección 3', se utilizó para generar mediante PCR inversa la construcción U2mod con los oligonucleótidos:

U2mA, 5'-AAAGGCTGTCTTCGCATGCGCTCGCCTTCGCGCCC-3';

U2mB, 5'-TGGCTATCTCTCGAGTATCAGTTTAATATCTGATAC-3'.

ES 2 336 909 T3

La construcción U2BP derivó U2mod mediante PCR inversa con los oligonucleótidos:

U2X: 5'-CTCGAGAGATAGCCAAAAGGCTGTCTTCGCATGCGCTCGCC-3';

5 U2BP: 5'-AAAAAGAAGAAAAAGAAAAATTAGAACTATCAGTTTAATATCTGATACG-3'.

Construcciones retrovirales

10 *Construcciones de cadena sencilla antisentido*

Se amplificó U2BP mediante PCR directa utilizando los oligonucleótidos:

U2cas arriba 5'-CTAGCTAGCCAGGCCTTCGGCTTCTTCGACTGGG-3';

15 U2cas abajo 5'-CTAGCTAGCGCGCGTCACAGGACTCGTGCAAGCC-3'.

Los fragmentos resultantes se clonaron en la orientación directa en el sitio NheI del vector retroviral pBabe puro (23). Los fragmentos BamHI que contenían la construcción quimérica completa U1-5' se insertaron en el sitio NheI de pBabe modificado con adaptadores BgIII.

Construcciones de cadena doble antisentido

25 La construcción 5'/BP se realizó mediante la clonación del fragmento BamHI que contenía la región codificante 5' U1 en el interior del plásmido U2BP. Esta construcción se amplificó con los oligonucleótidos U2cas arriba y U1cas abajo y se clonó en el sitio NheI del vector pBabe.

30 *Línea celular de empaquetamiento*

Se cultivó la línea celular de empaquetamiento Phoenix (<http://www.stanford.edu/nolan>) en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con FCS al 10% y penicilina-estreptomina (GIBCO/BRL) al 1%. Se recogieron partículas retrovirales de las células Phoenix transfectadas de forma transitoria con 4 µg de las diversas construcciones de pBabe utilizando Lipofectamina plus (GIBCO/BRL) y se utilizaron para transducir la línea celular del paciente con DMD.

Cultivo celular

40 La biopsia derivada de Duchenne (491A) se puso en un cultivo y se mantuvo en RPMI complementado con FCS al 15%, penicilina-estreptomina al 1% y glutamina al 1% (GIBCO/BRL). Las células se propagaron mediante tripsinización estándar y se cultivaron directamente en una placa recubierta de colágeno. (colágeno de cola de rata de tipo 1, BD). La infección de las células se llevó a cabo en ausencia de cualquier antibiótico. Un día antes de la infección, las células se emplacaron con una densidad de aproximadamente 5x10⁵ células por placa de 100 mm. Se realizaron dos ciclos de infecciones con los diferentes sobrenadantes virales; 48 h después de la infección se dividieron las células y se añadió puromicina a la concentración final de 1 mg/ml (Sigma).

50 *Preparación y análisis de ARN*

Se preparó ARN celular total utilizando el sistema de aislamiento de ARN Ultraspec (BIOTECX Laboratories, INC.) según el protocolo de fabricación. Para el análisis por transferencia Northern, se cargaron 8 µg de ARN total en geles de poliacrilamida al 6% - urea 7 M, se transfirieron e hibridaron con las siguientes sondas antisentido específicas:

55 U1a 5'-ATCAAGCAGAAGGTATGAGAAAAA-3';

U2a 5'-GTTTCTAATTTTCTTTTCTTC-3'.

60 Se llevó a cabo una RT-PCR con 200 ng de ARN total durante 40 ciclos de amplificación utilizando en sistema Access RT-PCR (Promega). La primera amplificación se realizó con los cebadores:

E46F, 5'-GAATTTGTTTTATGGTTGGAGG-3;

65 E54F, 5'-CTTTTATGAATGCTTCTCCAAG-3'.

ES 2 336 909 T3

Se utilizaron dos microlitros del producto de RT-PCR como molde en una PCR anidada secundaria de 50 μ l utilizando los oligonucleótidos:

E47F, 5'-TTACTGGTGGGAAGAGTTGCC-3' (exón 47) y

E52R 5'-TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC-3' (exón 52).

La PCR anidada se llevó a cabo durante 30 ciclos. Los productos anidados se analizaron en gel de agarosa al 2,5% y se purificaron bandas específicas para el análisis de la secuencia utilizando el kit de extracción QIAquick Gel (Qiagen). La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante M-medical utilizando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems) y se analizó en un secuenciador ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems).

Microinyecciones en ovocitos de X. laevis

El pre-ARN AdMI tiene 253 nucleótidos de largo y comprende una parte del transcrito primario tardío del Adenovirus. Se obtiene mediante transcripción *in vitro* del plásmido pAdML-Di1 digerido con Sca I (38). Los ARN AdML y U6 marcados con 32 P (1,5x10⁶ y 0,4x10⁶ cpml/ μ l, respectivamente) se inyectaron simultáneamente en ovocitos que habían recibido la noche anterior los plásmidos U2-BP o U2h (4 ng/ovocito). Después de la incubación durante 1 hora, se extrajo el ARN y se analizó en gel de poliacrilamida al 6%-urea.

Análisis por transferencia Western

Las células cultivadas se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) enfriado en hielo y, a continuación, se lisaron durante 40 minutos a 4°C en un tampón que contenía Tris-HCl 500 mM pH 8, NaCl 150 mM, NaF 100 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 al 1%, glicerol al 10% y complementado con varios inhibidores de proteasas (leupeptina, PMSF, apoproteína). Después de depurar mediante centrifugación a 15.300 rpm durante 10 minutos, se cuantificó el contenido de proteína mediante el Ensayo de Proteínas BIO-RAD (BIO-RAD). Se separaron 100 microgramos de proteínas en un gel de poliacrilamida al 6% que contenía SDS al 0,1%, Tris HCl 150 mM pH 8,8 y se transfirió a una membrana de transferencia de PVDF Polyscreen (Nen Life Science). Después del tratamiento con leche desnatada en polvo al 5% en solución salina tamponada con Tris Tween (TBS-T), la membrana se incubó con anticuerpo monoclonal de ratón NCL-DYS1 (Novocastra Laboratories Ltd) diluido 1:100 durante 60 minutos, seguido de tres lavados en tampón TBS-T e incubación con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano picante (1:1000; Amersham Pharmacia Biotech) durante 45 minutos. La detección de proteínas se llevó a cabo con un sustrato quimioluminiscente superseñal (PIERCE).

Resultados

Construcción de los ARN antisentido quiméricos

A partir de los casos disponibles, los autores seleccionaron uno, el paciente 491 A, que presentaba una delección que comprendía los exones 48, 49 y 50 (Ricci y Galluzzi, comunicación personal). En este caso, la omisión del exón 51 produciría un ARNm en el marco de lectura que codifica para una proteína de 210 aminoácidos más corta que la distrofina de tipo salvaje (figura 1, parte superior).

El ARNsn U1 se diseñó para sustituir 8 nucleótidos en su extremo 5' con una secuencia de 24 nucleótidos de longitud complementaria a la correspondiente región a lo largo de la unión por corte y empalme del exón/intrón 51 (construcción U1-5'; figura 1A). Esta elección fue debida al hecho de que la región terminal 5' de ARNsn U1 es normalmente una conformación de cadena sencilla y está implicada en el reconocimiento de la unión por corte y empalme en 5' de pre-ARNm (14). La expresión del ARN quimérico está dirigida por el promotor dependiente de la polimerasa II del gen de ARNsn U1, el cual se observó previamente que impulsaba la producción de niveles elevados de transcritos (15). También es posible eliminar la región del ARNsn U1 que se une a la proteína de 70 kDa que está implicada en la activación del sitio de corte y empalme en 3' del intrón en dirección 5' y/o insertar tanto en U1 como en U2 las cadenas dobles antisentido de la molécula.

El otro tipo de vector de ARN utilizado es el ARNsn U2. Este ARN está implicado normalmente en la reacción de corte y empalme, ya que reconoce la secuencia del sitio de ramificación intrónica y dirige la entrada, en el complejo de corte y empalme ("spliceosome"), del ARNsn U6 catalítico (21, 22). Tanto el reconocimiento del ARNsn U2 para el sitio de ramificación como su interacción con ARN-sn U6 son mediados por las interacciones de las parejas de bases. En el diseño de los autores, se produjo en primer lugar un derivado U2 (U2mod) con mutaciones en la región de emparejamiento a ARNsn U6. Se realizaron sustituciones de nucleótidos de manera que no afectaba a la estructura secundaria del ARNsn U2 (figura 1B). La falta de interacción con el ARNsn U6 debería asegurar que el ARNsn U2 modificado no interfiere con el aparato de corte y empalme celular y no recluta el complejo de corte y empalme en el intrón al que se empareja. Posteriormente se modificó U2mod, de manera que la región de emparejamiento del sitio de ramificación se sustituyó por 28 nucleótidos complementarios al sitio de ramificación y a la región 3' del intrón 50, dando lugar a la construcción U2-BP (figura 1B).

Todas las construcciones descritas se clonaron por separado o por parejas en la LTR 3' (región de U3) del vector retroviral pBabe puro y se obtuvieron las partículas virales mediante la transfección de ADN plasmídicos en la línea celular de empaquetamiento Phoenix (23).

Transducción de construcciones antisentido en células derivadas de DMD y análisis de su expresión

Las células de una biopsia muscular del paciente de DMD 491A se colocaron en un cultivo y se immortalizaron mediante integración mediada por retroviral de un antígeno T grande de SV40 de tipo salvaje (24). Las células inmortalizadas se infectaron con partículas retrovirales recombinantes y se seleccionaron las integraciones estables en medio que contenía puromicina.

La expresión de los ARN antisentido se controló mediante análisis Northern sobre el crecimiento de la población celular total en presencia de puromicina. La figura 2 muestra que todas las construcciones expresan los ARN quiméricos a niveles bastante buenos.

Los experimentos de microinyección en ovocitos de *X. laevis* mostraron que todas las construcciones descritas anteriormente se expresan a niveles elevados y que todas ellas se localizan específicamente en el compartimento nuclear. Estos resultados demuestran que las modificaciones introducidas en los diferentes ARNs no afectan ni a su estabilidad global ni a su localización subcelular.

Se conoce que la construcción U1 no interfiere en las funciones celulares endógenas (30, 31). Para determinar si un exceso de la forma modificada de ARN-sn U2 interfería con la eficacia del mecanismo de corte y empalme, se acumularon productos de corte y empalme de un pre-ARNm de control. Se inyectó previamente pre-ARNm de AdML marcado con ³²P (véase la sección Materiales y Métodos) en los núcleos de ovocitos de *X. laevis* con el gen U2h o U2-BP. El ARNsn U6 marcado con ³²P se inyectó simultáneamente como control interno. La figura 3A muestra que no se observa reducción en la eficacia del corte y empalme cuando se sobreexpresa la construcción con la molécula U2 antisentido en los núcleos en comparación con la sobreexpresión del ARNsn U2h de tipo salvaje. También se realizó un análisis por transferencia Northern en los ovocitos para verificar la expresión de los ADN inyectados. El panel B) muestra la expresión U2-BP y el panel C) la expresión del ARNsn U2h de control. La expresión específica U2h se revela mediante la presencia de un ARNsn de pre-U2 que se acumula específicamente en los ovocitos (37). Por lo tanto, la sobreexpresión U2-BP no interfiere con la eficacia del mecanismo de corte y empalme.

Análisis del ARNm producido en respuesta a un tratamiento antisentido

Se analizaron poblaciones de células mixtas que expresan diferentes tipos de construcciones de cadena sencilla quiméricas mediante RT-PCR por la presencia o ausencia de exón 51 en el ARNm maduro. La figura 4 muestra el análisis en gel de los productos de la RT-PCR obtenidos con parejas específicas de oligonucleótidos especificados en la parte superior de cada panel. De la primera serie de células analizadas, sólo U1-5' produjo una banda apenas perceptible correspondiente al tamaño de un producto en el que se omitió el exón 51. Si se compara con la cantidad del producto sin dicha omisión, parece ser que menos de un 10% del ARNm no contenía el exón 51.

Para determinar si la eficacia de la corrección aumenta en presencia de ARN antisentido contra ambas uniones por corte y empalme, se realizó una construcción adicional en la que las parejas de construcciones antisentido se clonaron en tándem en el interior del vector retroviral pBabe (figura 5A). Además, en este caso, se infectaron células de DMD inmortalizadas con partículas retrovirales recombinantes y se seleccionaron integraciones estables en medio que contenía puromicina.

La expresión de estas construcciones de cadena doble antisentido se analizó *in vivo* mediante análisis Northern. La figura 5B muestra que la clonación de cabeza a cola no interfiere con la expresión eficaz de ambos ARN quiméricos.

A continuación, se analizó mediante RT-PCR la omisión del exón 51 en los mioblastos de DMD que transportan las construcciones de cadena doble antisentido. La figura 5C muestra que la construcción 5'/BP produce la aparición de una banda que corresponde con el tamaño de un producto con omisión (217 nucleótidos de largo). El análisis de la secuencia de la banda purificada por gel indicó que el producto con omisión contiene una fusión exacta del exón 47 con el exón 52. Estos datos respaldan la hipótesis previa de que ambas uniones por corte y empalme deben estar enmascaradas por las secuencias antisentido a efectos de presentar una omisión eficaz del exón 51. En la construcción 5'/BP, la cantidad de producto con omisión es del orden del 30-40%.

Rescate de la síntesis de la distrofina

Se analizó la síntesis de la distrofina mediante análisis Western en células 491A inmortalizadas transducidas con las construcciones de cadena doble antisentido. Se separaron cien microgramos de proteína total en un gel de poliacrilamida al 6% y, después de la transferencia, se hicieron reaccionar con anticuerpos específicos de la distrofina. En comparación con DMD no tratada (calle 491A), las células que expresan las construcciones antisentido muestran un rescate de la síntesis de la distrofina (figura 6). Los niveles de distrofina son bastante buenos si se comparan con los

niveles presentes en el control de células de músculo esquelético (calle SMC). La banda de migración más rápida (indicada por un punto) representaría un producto específico de degradación de la distrofina. Se esperaba la falta de diferencia de tamaño observada entre la distrofina normal y la inducida en la transferencia Western, ya que la eliminación de los exones 48 a 51, que codifican para 210 aminoácidos, no alteraría de forma significativa la migración de una proteína tan grande (427 Kda) en un gel de poliacrilamida. El panel inferior en la figura 6 muestra un control del análisis por transferencia Western en el mismo gel con anticuerpos anti-miosina.

Referencias

- 1) Koenig, M., y otros (1989) *Am J Hum Genet.* 45, 498-506.
- 2) Hodgson, S. V. & Bobrow, M. (1989) *Br Med Bull.* 45, 719-744.
- 3) Zatz, M., Lange, K. & Spence, M. A. (1977) 1, 759.
- 4) Gussoni, E., Blau, H. M. & Kunkel, L. M. (1997) *Nat Med.* 3, 970-977.
- 5) Partridge, T. A., y otros (1989) *Nature* 337, 176-9.
- 6) Wang, B., Li, J. & Xiao, X. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13714-13719.
- 7) Campeau, P., y otros (2001) *Gene Ther.* 8, 1387-1394.
- 8) Cho, W. K., y otros (2000) *Hum Gene Ther* 11, 701-14.
- 9) Chen, H. H., y otros (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1645-50.
- 10) van Deutekom, J. C., y otros (2001) *Hum Mol Genet.* 10, 1547-1554.
- 11) Mann, C. J., y otros (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 42-47.
- 12) Dunckley, M. G.; y otros (1998) *Hum Mol Genet.* 7, 1083-1090.
- 13) Wilton, S. D., y otros (1999) *Neuromuscul Disord.* 9, 330-338.
- 14) Zhuang, Y. & Weiner, A. M. (1986) *Cell.* 46, 827-835.
- 15) Michienzi, A., Prislei, S. & Bozzoni, I. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 7219-7224.
- 16) German, L., y otros (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 4929-4934.
- 17) Grimm, C., Stefanovic, B. & Schumperli, D. (1993) *EMBO J.* 12, 1229-1238.
- 18) Galli, G., y otros (1983) *Cell.* 34, 823-828.
- 19) Bond, U. M., Yario, T. A. & Steitz, J. A. (1991) *Genes Dev.* 5, 1709-1722.
- 20) Spycher, C., y otros (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4023-4030.
- 21) Datta, B. & Weiner, A. M. (1991) *Nature* 352, 821-824.
- 22) Sun, J. S. & Manley, J. L. (1995) *Genes Dev.* 9, 843-854.
- 23) Morgestem, J. P. & Land, H. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 3587-3596.
- 24) Berghella, L., y otros (1999) *Hum Gene Ther.* 10, 1607-1617.
- 25) Cech, T. R. (1989) *Biochem Int.* 18, 7-14.
- 26) Buonomo, S. B., y otros (1999) *RNA* 5, 993-1002.
- 27) Croke, S. T. (1998) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8, 133-134.
- 28) Kole, R. & Sazani, P. (2001) *Curr Opin Mol Ther* 3, 229-234.
- 29) Sierakowska, H., y otros (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12840-12844.

ES 2 336 909 T3

30) **Gorman, L., Mercatante, D. R. & Kole, R.** (2000) *J Biol Chem* 275, 35914-35919.

31) **Michienzi, A., y otros** (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 8955-8960.

5 32) **Suter, D., et al.** (1999) *Hum Mol Genet.* 8, 2415-2423.

33) **Bertrand, E., y otros** (1997) *RNA* 3, 75-88.

10 34) **Sullenger, B. A. & Cech, T. R.** (1993) *Science* (Ciencia) 262, 1566-1569.

35) **Bimstiel, M. L. & Schaufele, F.** (1988) en Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleo-protein particles (Estructura y función de partículas de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas mayores y menores), ed. Birnstiel, M. L. (Springer, Berlin), pág. 155-182.

15 36) **Baserga, S. J. & Steitz J. A.** (1993) en The RNA world (El mundo del ARN) (Gesteland R.F., y Atkins J.F., eds.), págs. 359-381. *Cold Spring Harbor Press*, Plainview. NY.

37) **You, C-H, Ares, M Jr & Weiner, A M** (1985) *Cell* 42, 193-202.

20 38) **Fragapane P., y otros** (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 1117-1125.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Gen que codifica un ARNsn U1 humano modificado, en el que el fragmento del gen U1 5' que transcribe la
región U1 que es de cadena sencilla, comprende una secuencia antisentido complementaria a las uniones por corte y
empalme en 5' y 3' de, como mínimo, una secuencia de exón del pre-ARNm de la distrofina, de manera que, como
mínimo, se omite una secuencia de exón del pre-ARNm de la distrofina durante el proceso de corte y empalme que
convierte el pre-ARNm en el ARNm maduro.

2. Gen, según la reivindicación 1, en el que el ARNsn U1 humano modificado se modifica adicionalmente, de
manera que se elimina el fragmento del gen U1 que transcribe la secuencia de ARN que interacciona con la proteína
de 70K asociada a U1.

3. Gen, según la reivindicación 1 ó 2, en el que se omite, como mínimo, el exón 51 del pre-ARNm de la distrofina.

4. ARNsn U1 humano modificado transcrito por el gen según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Vector para la expresión estable y eficaz en células diana que expresan la distrofina que transcribe el ARNsn U1
humano modificado según la reivindicación 4.

6. Vector, según la reivindicación 5, que es un vector retroviral, adenoviral o viral adeno-asociado.

7. Vector, según la reivindicación 5 ó 6, adecuado para una transferencia a células madre o a células de fibra
muscular.

8. Gen, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, ARNsn U1 humano modificado, según la reivindicación 4,
o vector, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para su utilización en un método de tratamiento del cuerpo
humano o animal mediante terapia.

9. Gen, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, ARNsn U1 humano modificado, según la reivindicación 4,
o vector, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para su utilización en el tratamiento de la Distrofia Muscular
de Duchenne.

10. Utilización de un gen, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un ARNsn U1 humano modificado, según
la reivindicación 4, o un vector, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la fabricación de un medicamento
para su utilización en el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne.

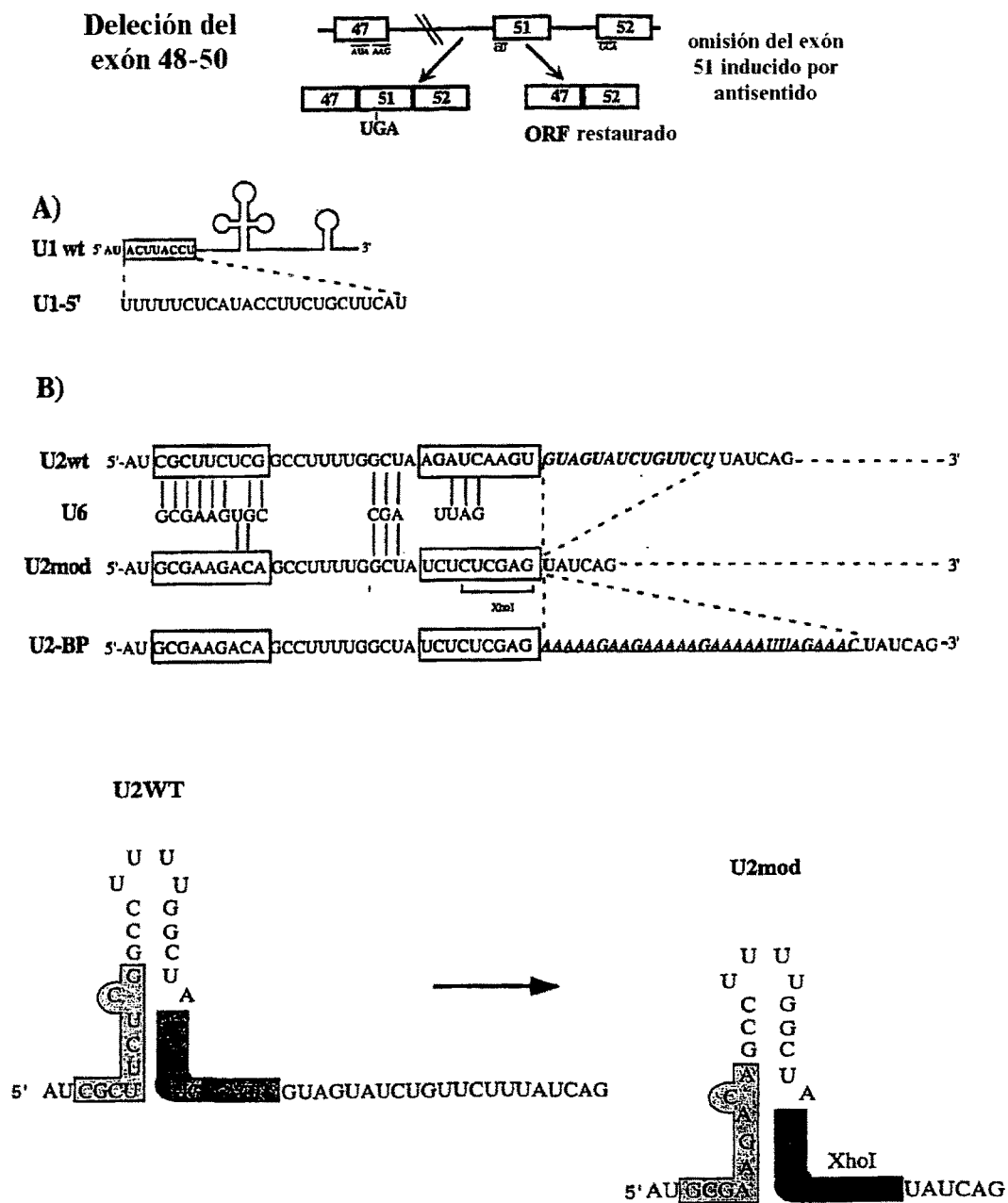


FIG. 1

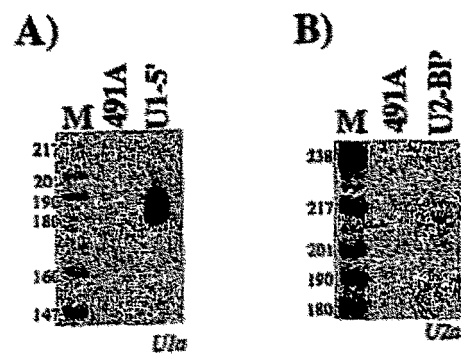


FIG. 2

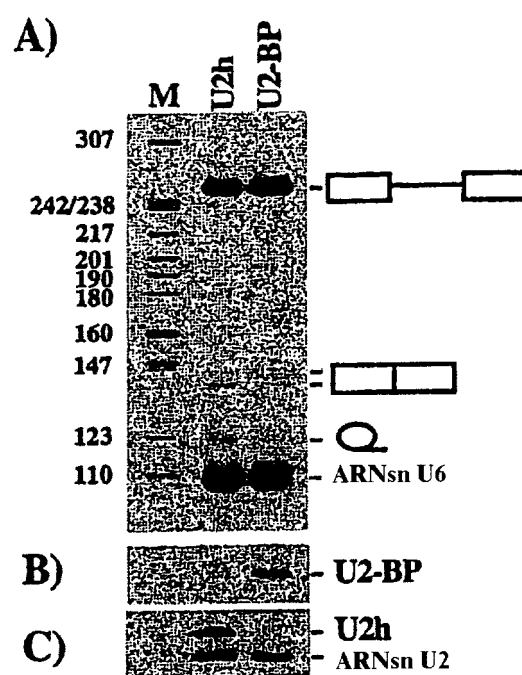


FIG. 3

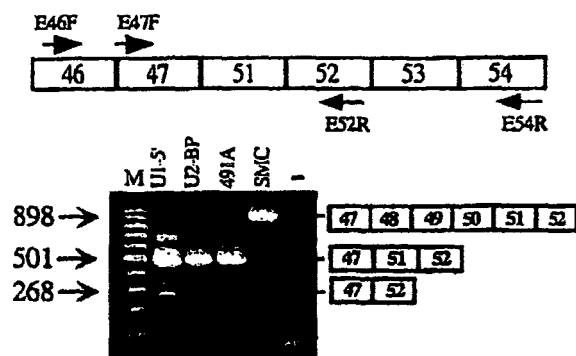


FIG. 4

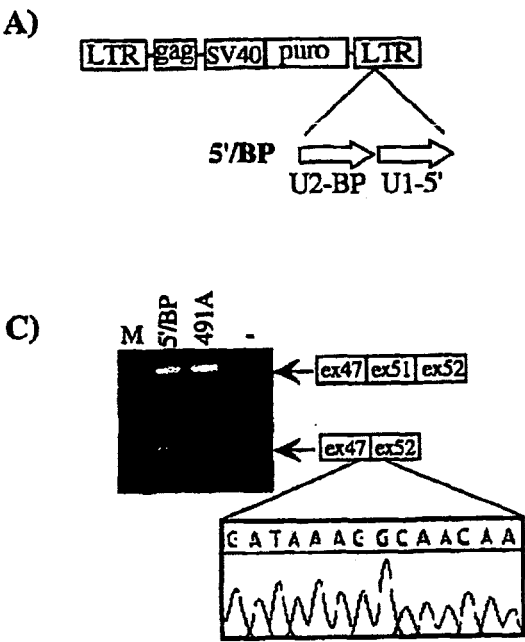


FIG. 5

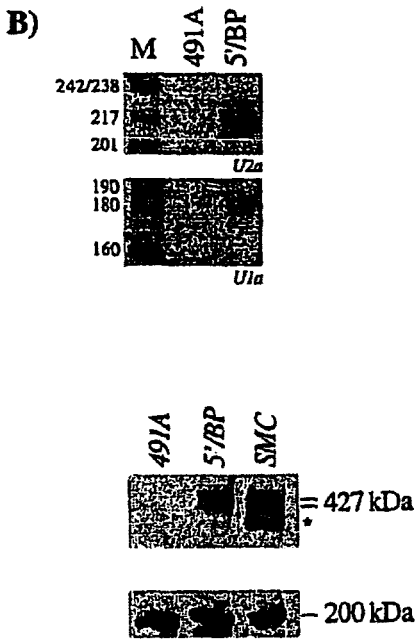


FIG. 6

ES 2 336 909 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Università degli Studi di Roma La Sapienza	
5	<120> MOLÉCULAS DE ARN ^{sn} QUIMÉRICAS QUE TRANSPORTAN SECUENCIAS ANTISENTIDO CONTRA LAS UNIONES POR CORTE Y EMPALME DEL GEN DE LA DISTROFINA Y SUS APLICACIONES TERAPÉUTICAS	
	<130> 30130	
10	<160> 16	
	<170> PatentIn version 3.1	
	<210> 1	
	<211> 32	
15	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> anti 24+2A	
	<400> 1	
25	gtatgagaaa aaatgagatc ttgggcctct gc	32
	<210> 2	
	<211> 33	
	<212> ADN	
30	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ANTI 24+2B	
35	<400> 2	
40	cttctgcttg atggcagggg agataccatg atc	33
	<210> 3	
	<211> 29	
	<212> ADN	
45	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> U1cas A	
50	<400> 3	
	cctggtacca tgagatcttg ggcctctgc	29
55	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> U1cas B	
65	<400> 4	
	cctctcgagc tgactttctg gagtttc	27

ES 2 336 909 T3

	<210> 5		
	<211> 35		
	<212> ADN		
5	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> U2mA		
10	<400> 5		
	aaaggctgtc ttgcatgcg ctgccttcg cgccc		35
15	<210> 6		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> U2mB		
25	<400> 6		
	tggctatctc tcgagtatca gttaatatc tgatac		36
30	<210> 7		
	<211> 41		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> U2X		
	<400> 7		
40	ctcgagagat agccaaaagg ctgtcttcgc atgcgctcgc c		41
	<210> 8		
45	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> U2BP		
	<400> 8		
55	aaaaagaaga aaaagaaaaa ttagaaacta tcagttaat atctgatacg		50
	<210> 9		
	<211> 34		
60	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
65	<223> U2cas arriba		

ES 2 336 909 T3

<400> 9

ctagctagcc aggccttcgg cttctcgac tggg

34

5

<210> 10

<211> 34

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> U2cas abajo

15 <400> 10

ctagctagcg cgcgtcacag gactcgtgca agcc

34

20 <210> 11

<211> 24

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25

<220>

<223> U1a

30 <400> 11

atcaagcaga aggtatgaga aaaa

24

35 <210> 12

<211> 23

<212> ADN

<213> secuencia artificial

40

<220>

<223> U2a

<400> 12

45

gtttctaatt ttcttttc ttc

23

<210> 13

50 <211> 22

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

55

<223> E46F

<400> 13

60

gaatttggtt tatggttga gg

22

<210> 14

<211> 22

65

<212> ADN

<213> secuencia artificial

ES 2 336 909 T3

	<220>	
	<223> E54F	
5	<400> 14	
	cttttatgaa tgcttctcca ag	22
10	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> E47F	
	<400> 15	
20	ttactggtgg aagagtgcc	20
	<210> 16	
25	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> E52R	
	<400> 16	
35	ttcgatccgt aatgattgtt ctagcc	26
40		
45		
50		
55		
60		
65		