

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 315 788**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2001 E 05076770 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **08.01.2020 EP 1619249**

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

30 Prioridad:

21.09.2000 EP 00203283

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

17.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 315 788 T5

DESCRIPCIÓN

Inducción de la omisión de exón en células eucarióticas

Considerando los rápidos avances de la investigación del genoma humano, los profesionales y la sociedad esperan que el futuro próximo nos traerá - además de la comprensión de mecanismos de enfermedad y diagnósticos
5 afinados y confiables - también terapias para muchas enfermedades genéticas devastadoras.

Aunque se espera que para algunas enfermedades (por ejemplo, metabólicas) el avance en los conocimientos traerá terapias de pequeñas moléculas fácilmente administrables, es probable que en la mayor parte de los casos será por último requerida una u otra forma de terapia génica, es decir la corrección, adición o el reemplazo del producto
génico defectuoso.

En los últimos años, la investigación y el desarrollo en este campo ha destacado varias dificultades técnicas que tienen que ser superadas, por ejemplo, lo relacionado con el gran tamaño de muchos genes implicados en enfermedades genéticas (limitando la elección de sistemas convenientes para administrar el gen terapéutico), la
10 accesibilidad del tejido en el cual el gen terapéutico debe funcionar (requiriendo el diseño de técnicas de reconocimiento específicas, físicamente por inyección restringida o biológicamente, desarrollando sistemas con afinidades específicas de tejido) y la seguridad frente al paciente del sistema de administración. Estos problemas
15 están hasta cierto punto interrelacionados y puede ser concluido de forma general que cuanto más pequeño sea el agente terapéutico, más fácil será desarrollar sistemas de administración eficientes, dirigibles y seguros.

La presente invención se refiere a este problema mediante la inducción de las llamadas omisiones de exón en las células. Las omisiones de exón dan como resultado un mRNA maduro que no contiene el exón omitido y así, cuando
20 dicho exón codifica para aminoácidos puede conducir a la expresión de un producto modificado. La tecnología de omisión de exón se dirige actualmente hacia el uso de los denominados 'oligonucleótidos antisentido' (ONA). La mayor parte de este trabajo se hace en el modelo de ratón mdx para la distrofia muscular de Duchenne (DMD). El ratón mdx, que lleva una mutación sin sentido en el exón 23 del gen de la distrofina, ha sido usado como un modelo animal de la distrofia muscular de Duchenne. A pesar de la mutación mdx, que debería impedir la síntesis de una
25 proteína de distrofina funcional, rara y que se da naturalmente, se han observado fibras con niveles positivos de distrofina en el tejido muscular mdx. Se piensa que estas fibras distrofina-positivas se han generado de un mecanismo de omisión de exon aparentemente natural, debido a mutaciones somáticas o por empalme alternativo. Los ONA dirigidos, respectivamente, a los sitios de empalme 3' y 5' de los intrones 22 y 23 en pre-mRNA de distrofina, se ha demostrado que interfieren con factores normalmente implicados en la eliminación del intron 23 de modo que también el exón 23 fue eliminado del mRNA (Wilton, 1999). En un estudio similar, Dunckley *et al.* (1998)
30 mostraron que la omisión de exón usando ONA dirigidos a los sitios de empalme 3' y 5' puede tener resultados inesperados. Ellos observaron la falta de no sólo el exón 23 sino también de los exones 24-29 causando así un mRNA que contenía una unión del 30 exón - exón 22. No se conoce el mecanismo subyacente para la aparición de la variante de empalme 22-30 inesperada. Podría ser debido a que los sitios de empalme contienen secuencias consenso que conducen a una hibridación promiscua del oligo usado para dirigir la omisión de exón. La hibridación del oligo a otros sitios de empalme que los sitios del exón que se omite podría interferir fácilmente por supuesto con la exactitud del proceso de empalme. Por otra parte, podría carecerse de exactitud debido a que tienen que ser
35 usados los dos oligos (para el sitio de empalme 5' y 3'). El pre-mRNA que contiene uno pero no el otro oligo podría tender a variantes de empalme inesperadas. Para superar estos y otros problemas la presente invención proporciona un método para dirigir el empalme de un pre-mRNA en un sistema capaz de realizar una operación de empalme que comprende poner en contacto dicho pre-mRNA en dicho sistema con un agente capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento de exón de al menos un exón en dicho pre-mRNA, comprendiendo además dicho método permitir el empalme de dicho pre-mRNA. La interferencia con una secuencia de reconocimiento de exón tiene la ventaja de que tales elementos se localizan dentro del exón. Proporcionando un
40 oligo antisentido para el interior del exón que se omite, es posible interferir con la secuencia de reconocimiento de exón enmascarando así con eficacia el exón del aparato de empalme. El fallo del aparato de empalme para reconocer al exón que falta conduce así a la exclusión del exón del mRNA final. La presente invención no interfiere directamente con el proceso enzimático de la maquinaria de empalme (la unión de los exones). Se piensa que esto permite que el método sea más robusto y fiable. Se piensa que una SIE es una estructura particular de un exón que
45 permite empalmar al aceptador y al donador para asumir una conformación espacial particular. En este concepto, es la conformación espacial particular la que permite que la maquinaria de empalme reconozca el exón. Sin embargo, la descripción no se limita ciertamente a este modelo. Se ha encontrado que los agentes capaces de unirse a un exón pueden inhibir a una SIE. Pueden ponerse en contacto expresamente agentes con dicho exón en cualquier punto y ser capaces todavía de inhibir expresamente dicha SIE. Dicho mRNA puede ser útil por sí mismo. Por
50 ejemplo, la producción de una proteína no deseada puede ser, al menos en parte, reducida inhibiendo la inclusión de un exón requerido en el mRNA. Preferentemente, un método de la invención comprende además permitir la traducción del mRNA producido a partir del empalme de dicho pre-mRNA. Preferentemente, dicho mRNA codifica una proteína funcional. En una realización preferida, dicha proteína comprende dos o más dominios, en la que al menos uno de dichos dominios es codificado por dicho mRNA como resultado de omitir al menos parte de un exón
55 en dicho pre-mRNA. La omisión del exón típicamente, aunque no sea necesariamente de importancia para las proteínas en la configuración tipo silvestre, teniendo al menos dos dominios funcionales que cada uno realiza una

función, en el que dichos dominios se generan a partir de partes distintas de la secuencia de aminoácidos primaria. Un ejemplo es, por ejemplo, los factores de transcripción. Típicamente, estos factores comprenden un dominio de unión de ADN y un dominio que se relaciona con otras proteínas en la célula. La omisión de un exón que codifica una parte de la secuencia de aminoácidos primaria que está entre estos dos dominios puede conducir a una proteína más corta que comprenda la misma función, al menos en parte. Así, las mutaciones perjudiciales en esta región intermediaria (por ejemplo, mutaciones de cambio de marco o de terminación) pueden ser, al menos en parte, reparadas induciendo la omisión de exón para permitir la síntesis de la proteína funcional más corta (en parte). Usando un método de la invención también es posible inducir la omisión parcial del exón. En esta realización, dicha puesta en contacto causa la activación de un sitio de empalme críptico en un exón puesto en contacto. Esta realización aumenta el potencial para la manipulación del pre-mARN conduciendo a una proteína funcional. Preferentemente, dicho sistema comprende una célula. Preferentemente, dicha célula es cultivada *in vitro* o en el organismo *in vivo*, típicamente aunque no necesariamente dicho organismo comprende a un ser humano o a un ratón.

Puede usarse para la presente invención cualquier agente capaz de inhibir específicamente una secuencia de reconocimiento de exón. Preferiblemente dicho agente comprende un ácido nucleico o su equivalente funcional. Preferiblemente, pero no necesariamente, dicho ácido nucleico está en una forma de cadena sencilla. El ácido nucleico peptídico y otras moléculas que comprenden las mismas características de unión del ácido nucleico en tipo, no necesariamente en cantidad, son equivalentes adecuados. El ácido nucleico o su equivalente puede comprender modificaciones que proporcionen una funcionalidad adicional. Por ejemplo, pueden usarse 2'-O-metil-oligo-ribonucleótidos. Estos ribonucleótidos son más resistentes frente a la acción de RNAsa que los oligonucleótidos convencionales.

En esta descripción, dicha señal de inclusión del exón es interferida por un ácido nucleico anti-sentido dirigido a una secuencia de reconocimiento de exón (SRE). Estas secuencias son relativamente ricas en purina y pueden ser distinguidas escudriñando la información de la secuencia del exón que se omite (Tanaka *et al.*, 1994 *Mol Cell Biol.* **14**: p. 1347-1354). Se piensa que las secuencias de reconocimiento de exón ayudan a la inclusión en el mARN de los llamados exones débiles (Achse *et al.*, 1996; *J. Biochem.* **120**; p. 53-60). Estos exones débiles comprenden, por ejemplo, sitios de empalme 5' y/o 3' que son menos eficazmente reconocidos por la maquinaria de empalme. En la presente invención se ha encontrado que la omisión del exón también puede ser inducida en los llamados exones fuertes, es decir, exones que son normalmente reconocidos eficazmente por la maquinaria de empalme de la célula. A partir de cualquier secuencia dada es (casi) siempre posible predecir si la secuencia comprende supuestos exones y determinar si estos exones son fuertes o débiles. Existen varios algoritmos para determinar la fuerza de un exón. Un algoritmo útil puede ser encontrado en el servidor de predicción de sitios de empalme NetGene2 (Brunak, *et al.*, 1991; *J Mol Biol* **220**: p. 49-65). En una realización preferida, un exón que es reconocido para la omisión es un exón fuerte.

Los métodos de la descripción pueden ser usados desde muchos puntos de vista. En una realización, se usa un método de la descripción para disminuir, al menos en parte, la producción de una proteína aberrante. Tales proteínas pueden ser, por ejemplo, onco-proteínas o proteínas virales. En muchos tumores no sólo la presencia de una onco-proteína sino también el nivel relativo de expresión han sido asociados al fenotipo de la célula tumoral. Del mismo modo, no sólo la presencia de proteínas virales sino también la cantidad de la proteína viral en una célula determinan la virulencia de un virus particular. Además, para una multiplicación eficiente y extendida de un virus el tiempo de respuesta de expresión en el ciclo vital y el balance en la cantidad de ciertas proteínas virales en una célula determina si los virus son eficazmente o ineficazmente producidos. Utilizando un método de la descripción es posible reducir la cantidad de proteína aberrante en una célula tal que, por ejemplo, una célula tumoral se hace menos tumorigénica (metastásica) y/o una célula infectada de un virus produce menos virus.

En una realización preferida, se usa un método de la invención para modificar dicha proteína aberrante en una proteína funcional. En una realización, dicha proteína funcional es capaz de realizar una función de una proteína normalmente presente en una célula, pero ausente en las células que se tratan. Muy a menudo incluso la restauración parcial de la función causa un comportamiento considerablemente mejor de la célula así tratada. Debido al mejor comportamiento, tales células también pueden tener una ventaja selectiva respecto a células no modificadas ayudando así a la efectividad del tratamiento.

Este aspecto de la invención es, en particular, adecuado para la restauración de la expresión de genes defectuosos. Esto se consigue causando la omisión específica de exones reconocidos, para así evitar o corregir mutaciones deletéreas (típicamente mutaciones de terminación o mutaciones de punto de desplazamiento de marco, delecciones de exón simple o múltiple o inserciones que conducen a la terminación de la traducción).

Comparado con las estrategias de introducción de genes, esta nueva forma de terapia génica de la modulación del empalme requiere la administración de reactivos terapéuticos mucho más pequeños, típicamente, pero no limitado a, 14-40 nucleótidos. En una realización preferida, son usadas moléculas de 14-25 nucleótidos ya que estas moléculas son más fáciles de producir y de entrar en la célula con más eficacia. Los métodos de la invención permiten mucho más flexibilidad en el diseño subsecuente de sistemas de administración eficaces y seguros. Una ventaja adicional importante de este aspecto de la invención consiste en que restaura (al menos algo de) la actividad del gen

endógeno, que todavía posee la mayor parte o toda su circuitería génica reguladora, asegurando así niveles de expresión apropiados y la síntesis de isoformas específicas de tejido.

Este aspecto de la descripción puede ser, en principio, aplicado a cualquier enfermedad genética o predisposición genética a la enfermedad, en la que la omisión reconocida de exones específicos restauraría el marco de lectura translacional cuando éste haya sido interrumpido por la mutación original, a condición de que la traducción de una proteína interna ligeramente más corta sea todavía totalmente o parcialmente funcional. Otra realización preferida implica la restauración (parcial) de productos génicos defectuosos que tienen un efecto directo que causa una enfermedad, por ejemplo, la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), en la cual las delecciones de desplazamiento de marco, mutaciones de copias y de terminación en el gen de distrofina ligado a X causan una degradación del músculo severa y progresiva. La DMD es típicamente letal en la adolescencia tardía o en la adultez temprana, mientras que las delecciones de no desplazamiento de marco o las copias en el mismo gen causan la distrofia muscular de Becker (DMB) de mucha menor intensidad, compatible con una esperanza de vida de entre 35-40 y normal. En la realización según se aplica a DMD, la presente invención permite la omisión del exón para ampliar una delección existente (o cambiar el producto de mRNA de una copia existente) por tantos exones adyacentes como se requiera para restaurar el marco de lectura y generar una proteína ligeramente acortada internamente, pero todavía funcional. Basado en síntomas clínicos de mucha menor intensidad de pacientes con DMB con el equivalente de esta delección inducida, la enfermedad en los pacientes con DMD tendría un curso de mucha menor intensidad después de la terapia con ONA.

Muchas mutaciones diferentes en el gen de distrofina pueden conducir a una proteína disfuncional. (Para un inventario completo véase <http://www.dmd.nl>, la base de datos internacionalmente aceptada para la DMD y desórdenes relacionados.) El exón preciso que se omite para generar una proteína de distrofina funcional varía de mutación a mutación. Para esta descripción, la tabla 1 comprende una lista no restrictiva de exones que pueden ser omitidos y enumera para los exones mencionados algunas mutaciones del gen de distrofina que se dan con más frecuencia que han sido observadas en seres humanos y que pueden ser tratadas con un método de la descripción. La omisión del exón mencionado conduce a un mutante de la proteína distrofina que comprende al menos la funcionalidad de un mutante de Becker. Así, en una realización, la invención proporciona un método de la invención en el que dicha secuencia de reconocimiento de exón está presente en los números de exón 46 ó 51 del gen de distrofina humano. La aparición de ciertas variaciones de delección/inserción es más frecuente que otras. En la presente invención fue encontrado que induciendo la omisión del exón 46 con un medio o un método de la invención aproximadamente pueden ser tratados el 7 % de pacientes que contienen la delección de DMD, causando que dichos pacientes tengan fibras musculares positivas de distrofina. Induciendo la omisión del exón 51, pueden ser tratados aproximadamente el 15 % de pacientes que contienen la delección de DMD con un medio o método de la invención. Tal tratamiento causará que el paciente tenga al menos algunas fibras positivas de distrofina. Así, con la omisión del exón 46 ó 51 aproximadamente usando un método de la invención aproximadamente pueden ser tratados el 22 % de los pacientes que contienen una delección en el gen de distrofina. Así, en una realización preferida de la invención dicha secuencia de reconocimiento de exón está presente en el exón 46 o el exón 51. En una realización preferida y particular dicho agente comprende una secuencia de ácidos nucleicos según hONA N° 4, hONA N° 6, hONA N° 8, hONA N° 9, hONA N° 11 y/o uno o varios de hONA N° 21-30 con la excepción de hONA N° 29 o una parte funcional, derivado y/o análogo de dicho hONA N°. Una parte funcional, derivada y/o análoga de dichos hONA N° comprenden la misma actividad de omisión del exón en clase, en un método de la invención, no necesariamente en cantidad.

Puede ser ventajoso inducir la omisión del exón de más de un exón en el pre-mARN. Por ejemplo, considerando la amplia variedad de mutaciones y la naturaleza fija de las longitudes del exón y la secuencia de aminoácidos flanqueante a tales mutaciones, puede darse la situación de que para la restauración de la función más de un exón tenga que ser omitido. Un ejemplo, preferido pero no limitante, de tal caso en la base de datos de delección de DMD es una delección 46-50. Los pacientes que comprenden una delección 46-50 no producen distrofina funcional. Sin embargo, puede ser generada una distrofina funcional, al menos parcialmente, induciendo la omisión tanto del exón 45 como del exón 51. Otro ejemplo preferido pero no restrictivo es en pacientes que comprenden una copia del exón 2. Proporcionando un agente capaz de inhibir una secuencia de reconocimiento del exón 2, es posible omitir en parte uno o ambos exones dos, regenerando así la proteína tipo silvestre, cerca de la proteína omitido el exón dos truncado o doble. Otro ejemplo preferido pero no restrictivo es omitir los exones del 45 al 50. Esto genera una variante en marco tipo Becker. Esta variante tipo Becker puede ser generada para curar cualquier mutación localizada en los exones 45, 46, 47, 48, 49, y/o 50 o sus combinaciones. En un aspecto la invención proporciona por lo tanto un método de la invención que comprende además proveer dicha célula con otro agente capaz de inhibir una secuencia de reconocimiento del exón en otro exón de dicho pre-mARN. Por supuesto, está completamente dentro del ámbito de la invención usar a dos o más agentes para la inducción de la omisión del exón en pre-mARN de dos o más genes diferentes.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar a los agentes convenientes para la terapia de empalme y su validación como agentes de omisión de exón específicos en experimentos pilotos. Se proporciona un método para determinar si un agente es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón de un exón, que comprende proporcionar una célula que tiene un pre-mARN que contiene dicho exón, con dicho agente, cultivar dicha célula para permitir la formación de un mRNA a partir de dicho pre-mARN y determinar si dicho exón está ausente en dicho mRNA. En una realización preferida, dicho agente comprende el ácido nucleico o su

equivalente funcional, comprendiendo dicho ácido nucleico la complementariedad a una parte de dicho exón. Los agentes capaces de inducir la omisión del exón específica pueden ser identificados con un método de la invención. Es posible incluir una preantalla para agentes para la primera identificación si dicho agente es capaz de unirse con una afinidad relativamente alta al ácido nucleico que contiene el exón, preferentemente al ARN. Para este fin, se proporciona un método para determinar si un agente es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón de un exón, que comprende además primero determinar *in vitro* la afinidad de unión relativa de dicho ácido nucleico o su equivalente funcional a una molécula de ARN que comprende dicho exón.

En otro aspecto más, se proporciona un agente que es obtenible por un método de la invención. En una realización preferida dicho agente comprende el ácido nucleico o su equivalente funcional. Preferentemente dicho agente, cuando se usa para inducir la omisión del exón en una célula, es capaz de al menos reducir en parte la cantidad de proteína aberrante en dicha célula. Más preferentemente, dicha omisión del exón causa un mARN que codifica una proteína que es capaz de realizar una función en dicha célula. En una realización, en particular preferida, dicho pre-mARN es derivado de un gen de distrofina. Preferentemente, dicha proteína funcional comprende a una proteína de distrofina mutante o normal. Preferentemente, dicha proteína de distrofina mutante comprende al menos la funcionalidad de una proteína de distrofina en un paciente de Becker. En una realización, en particular preferida, dicho agente comprende la secuencia de ácidos nucleicos de hONA N° 4, hONA N° 6, hONA N° 8, hONA N° 9, hONA N° 11 y/o uno o varios de hONA N° 21-30 con la excepción de hONA N° 29 o una parte funcional, derivada y/o análoga de dicho hONA N°. Una parte funcional, derivada y/o análoga de dichos hONA N° comprende la misma actividad de omisión de exón en clase, en un método de la invención, no necesariamente en cantidad.

La técnica describe muchos modos para administrar agentes a células. En particular, se han desarrollado extensamente métodos para administrar ácidos nucleicos. El experto en la técnica es muy capaz de determinar si un método de administración es conveniente para realizar la presente invención. En un ejemplo no restrictivo dicho método incluye la introducción de un agente de la invención en liposomas, siendo proporcionados dichos liposomas a células que comprenden un pre-mARN diana. Los liposomas son en particular adecuados para la administración de ácidos nucleicos a células. Las moléculas antisentido capaces de inducir la omisión del exón pueden ser producidas en una célula bajo la administración del ácido nucleico que contiene una unidad de transcripción que produce el ARN antisentido. Los ejemplos no restrictivos de unidades de transcripción convenientes son ARN nuclear pequeño (SNRP) o unidades de transcripción tARN. La invención por lo tanto proporciona además un vehículo de administración de ácidos nucleicos que comprende un ácido nucleico o su equivalente funcional de la invención capaz de inhibir una secuencia de reconocimiento de exón. En una realización, dicho vehículo de administración es capaz de expresar dicho ácido nucleico de la invención. Por supuesto, en el caso de que, por ejemplo, sean usados virus monocatenarios como vehículo, está completamente dentro del ámbito de la invención cuando tal virus comprende sólo la secuencia antisentido de un agente de la invención. En otra realización de ONA de virus monocatenarios de la invención son codificados por ARN nuclear pequeño o unidades de transcripción tARN en nucleico viral encapsulado por el virus como vehículo. Un virus monocatenario preferido es el virus adeno-asociado.

En otra realización más, la invención proporciona el uso de un ácido nucleico o un vehículo de administración de ácidos nucleicos de la invención para la preparación de un medicamento. En una realización preferida dicho medicamento es usado para el tratamiento de una enfermedad heredada. Más preferentemente, dicho medicamento es usado para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne.

La invención proporciona un método para dirigir el empalme de un pre-mARN en un sistema capaz de realizar una operación de empalme que comprende poner en contacto dicho pre-mARN en dicho sistema con un agente capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento de exón de al menos un exón en dicho pre-mARN, comprendiendo dicho método además permitir el empalme de dicho pre-mARN. Preferentemente dicho método comprende además permitir la traducción del mARN producido a partir del empalme de dicho pre-mARN. Preferentemente dicho mARN codifica a una proteína funcional. Preferentemente dicha proteína comprende dos o más dominios, en la que al menos uno de dichos dominios es codificado por dicho mARN como resultado de omitir al menos parte de un exón en dicho pre-mARN. Preferentemente dicha puesta en contacto causa la activación de un sitio de empalme crítico en un exón puesto en contacto.

La invención proporciona un método, al menos en parte, para disminuir la producción de una proteína aberrante en una célula, comprendiendo dicha célula pre-mARN que comprende exones que codifican para dicha proteína, comprendiendo el método proveer dicha célula con un agente capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón de al menos uno de dichos exones, comprendiendo el método además permitir la traducción del mARN producido a partir del empalme de dicho pre-mARN.

Preferentemente dicha secuencia de reconocimiento del exón está presente en un exón que comprende un par donador / aceptador de fuerte empalme. Preferentemente dicha traducción causa una proteína de distrofina mutante o normal, preferentemente, en la que dicha proteína de distrofina mutante es equivalente a una proteína de distrofina de un paciente de Becker. Dicha secuencia de reconocimiento del exón está preferentemente presente en el exón número 46 ó 51.

Un agente en la presente invención preferentemente comprende un ácido nucleico o su equivalente funcional. Preferentemente dicho ácido nucleico contiene entre 15-25 nucleótidos o su equivalente funcional.

Un método de la invención preferentemente comprende además proporcionar dicha célula con otro agente capaz de inhibir una secuencia de reconocimiento del exón presente en otro exón de dicho pre-mARN.

- 5 La invención proporciona un método para determinar si un ácido nucleico o su equivalente funcional, que comprende la complementariedad a una parte de un exón, es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón de dicho exón, que comprende proporcionar una célula que tiene un pre-mARN que contiene dicho exón, con dicho ácido nucleico, cultivar dicha célula para permitir la formación de un mARN de dicho pre-mARN y determinar si dicho exón está ausente de dicho mARN. Preferentemente dicho método comprende además determinar la afinidad de unión *in vitro* relativa a dicho ácido nucleico o su equivalente funcional a una molécula de ARN que comprende dicho exón.

- 10 La invención proporciona un ácido nucleico o su equivalente funcional obtenible por un método de la invención para determinar si un ácido nucleico o su equivalente funcional, comprendiendo la complementariedad a una parte de un exón, es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón de dicho exón. La invención proporciona un vehículo de administración de ácidos nucleicos que comprende el ácido nucleico arriba mencionado, o su complemento. La invención proporciona un vehículo de administración de ácidos nucleicos capaz de expresar un ácido nucleico obtenible por un método de la invención para determinar si un ácido nucleico o su equivalente funcional, comprendiendo la complementariedad a una parte de un exón, es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón de dicho exón.

- 15 La invención proporciona un uso de un ácido nucleico obtenible por un método de la invención para determinar si un ácido nucleico o su equivalente funcional, comprendiendo la complementariedad a una parte de un exón, es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón de dicho exón o un vehículo de administración de ácidos nucleicos de la invención, para la preparación de un medicamento.

- 20 La invención proporciona un uso de un ácido nucleico obtenible por un método de la invención para determinar si un ácido nucleico o su equivalente funcional, comprendiendo la complementariedad a una parte de un exón, es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón de dicho exón o un vehículo de administración de ácidos nucleicos de la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad heredada.

- 25 La invención proporciona un uso de un ácido nucleico o su equivalente, comprendiendo una secuencia de reconocimiento del exón, que inhibe la calidad para la preparación de un medicamento.

- 30 La descripción proporciona un animal no humano provisto de un ácido nucleico obtenible por un método de la invención para determinar si un ácido nucleico o su equivalente funcional, comprendiendo la complementariedad a una parte de un exón, es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón de dicho exón. Preferentemente dicho animal no humano comprende además un ácido nucleico que codifica una proteína humana o su equivalente funcional. Preferentemente dicho animal no humano comprende además una mutación silenciosa en el gen que codifica un homólogo animal de dicha proteína humana.

Breve descripción de los dibujos

- 35 Figura 1. La delección del exón 45 es una de las mutaciones DMD más frecuentes. Debido a esta delección el exón 44 es empalmado al exón 46, el marco de lectura de translación es interrumpido, y un codón de terminación es creado en el exón 46 conduciendo a una deficiencia de distrofina. El objetivo de los inventores es inducir artificialmente la omisión de un exón adicional, el exón 46, a fin de restablecer el marco de lectura y restaurar la síntesis de una proteína de distrofina, ligeramente más corta, pero en gran parte funcional, como se encuentra en los pacientes afectados de distrofia muscular de Becker de mucho de menor intensidad afectados por una delección tanto de los exones 45 y 46.

- 40 Figura 2. El exón 46 contiene una región rica en purina que se supone que tiene un papel potencial en la regulación de su empalme en el pre-mARN. Una serie de oligo-ribonucleótidos antisentido (ONA) de 2'O-metil-fosforioato sobrelapantes fue diseñada dirigida a esta región rica en purina en el exón 46 de distrofina de ratón. Los ONA difieren tanto en su longitud como en su secuencia. Las modificaciones químicas dan ONA resistentes a endonucleasas y RNAsaH dentro de las células musculares. Para determinar la eficacia de la transfección en los estudios *in vitro* de los inventores, los ONA contenían un grupo 5'fluoresceína que permitía la identificación de células ONA-positivas.

- 45 Figura 3. Para determinar la afinidad de unión de los diferentes ONA al ARN del exón 46 diana, los inventores realizaron ensayos de cambio de movilidad de gel. En esta figura, son mostrados los cinco mONA (mONA N° 4, 6, 8, 9 y 11) con afinidad más alta para el ARN diana. En la unión de los ONA al ARN, se forma un complejo que muestra

una movilidad de gel retrasada como puede ser determinado por el desplazamiento de la banda. La unión de los ONA a la diana fue específica a la secuencia. Un mONA aleatorio, es decir, no específico para el exón 46, no generó un desplazamiento de la banda.

Figura 4. Los ONA específicos de ratón y humano que mostraron la afinidad de unión más alta en los ensayos de cambio de movilidad de gel fueron transfectados en cultivos de miotubo de ratón y humano. (A) El análisis RT-PCR mostró un producto truncado, cuyo tamaño correspondió al exón 45 directamente empalmado al exón 47, en los cultivos celulares de ratón en la transfección con los diferentes mONA N° 4, 6, 9, y 11. Ninguna omisión del exón 46 fue detectada después de la transfección con un ONA aleatorio. (B) El análisis RT-PCR en los cultivos de célula de músculo humano derivados de un individuo no afectado (C) y dos pacientes con DMD no relacionados (P1 y P2) reveló productos truncados en la transfección con hONA N° 4 y hONA N° 8. En el control este producto correspondió al exón 45 empalmado al exón 47, mientras que en los pacientes el tamaño del fragmento correspondió al exón 44 empalmado al exón 47. No fue detectada ninguna omisión del exón 46 en los cultivos de célula no transfectadas o después de la transfección con hONA aleatorio. Las eficiencias más altas de omisión del exón 46 fueron obtenidas con hONA N° 8.

Figura 5. Datos de secuencia de los productos RT-PCR obtenidos de pacientes DL279.1 (correspondientes a P1 en la Figura 4), que confirmaron la delección del exón 45 en este paciente (panel superior), y la omisión adicional del exón 46 después de la transfección con hONA N° 8 (panel inferior). La falta del exón 46 fue específica, y el exón 44 fue exactamente empalmado al exón 47 lo que restablece el marco de lectura de translación.

Figura 6. Análisis inmunohistoquímico del cultivo de célula de músculo del paciente DL279.1 bajo la transfección con hONA N° 8. Las células fueron sometidas a dos anticuerpos de distrofina diferentes generados contra diferentes regiones de la proteína, localizadas próximas (ManDys-1, ex.-31-32) y distales (Dys-2, ex. 77-79) del exón 46 diana. El panel inferior muestra la ausencia de una proteína de distrofina en los miotubos, mientras que la omisión inducida de hONA N° 8 del exón 46 restauró claramente la síntesis de una proteína de distrofina como se detecta por ambos anticuerpos (panel superior).

Figura 7:

(A) Análisis RT-PCR del ARN aislado de cultivos de célula de músculo de control humanas tratadas con hONA N° 23, N° 24, N° 27, N° 28 o N° 29. Un producto truncado, con un tamaño correspondiente al exón 50 empalmado al exón 52 fue detectado en células tratadas con hONA N° 23 y N° 28. El análisis de secuencia de estos productos confirmó la omisión precisa del exón 51 (B). Un producto de empalme aberrante adicional fue obtenido en células tratadas con hONA N° 28 y N° 29. El análisis de secuencia reveló la utilización de un sitio de empalme críptico en marco dentro del exón 51 que se usa en una frecuencia baja bajo el tratamiento de ONA. El producto generado, incluyó un exón 51 parcial que también tenía un marco de lectura restaurado, confirmando así además el valor terapéutico.

Figura 8

(A) Los ensayos de cambio de movilidad de gel fueron realizados para determinar la afinidad de unión de los diferentes h29ONA N° para el ARN diana del exón 29. Cuando se comparaba al ARN no hibridado (ninguno), h29ONA N° 1, N° 2, N° 4, N° 6, N° 9, N° 10 y N° 11 generaban complejos con movilidades de gel inferiores, indicando su unión al ARN. Un ONA aleatorio derivado del exón 19 de distrofina no generó un complejo. (B) El análisis RT-PCR del ARN aislado de cultivos de célula de músculo control humanos tratados con h29ONA N° 1, N° 2, N° 4, N° 6, N° 9, N° 10 o N° 11 reveló un producto truncado cuyo tamaño correspondió al exón 28 empalmado al exón 30. Estos resultados indican que el exón 29 puede ser omitido expresamente usando los ONA dirigidos a secuencias dentro (h29ONA N° 1, N° 2, N° 4 o N° 6) o fuera (h29ONA N° 9, N° 10 o N° 11) de la SRE supuesta en el exón 29. Un producto de empalme aberrante adicional fue observado que resultó de omitir tanto el exón 28 como el exón 29 (confirmado por datos de secuencia no mostrados). Aunque este producto estuviera también presente en células no tratadas, sugiriendo que este acontecimiento de omisión alternativo pueda ocurrir naturalmente, fue realzado por el tratamiento de ONA. El ONA 19, derivado del exón 19 de distrofina, no indujo la omisión del exón 29 (C). La omisión específica del exón 29 fue confirmada por datos de secuencia de los fragmentos RT-PCR truncados. Aquí se muestra la secuencia obtenida del producto de omisión del exón 29 en células tratadas con h29ONA N° 1.

Figura 9

(A) Análisis de RT-PCR del ARN aislado de músculos gemelos de la pierna de ratón dos días después de la inyección de 5, 10 ó 20 µg de mONA N° 4, N° 6 o N° 11. Los productos truncados, con un tamaño correspondiente al exón 45 empalmado al exón 47, fueron detectados en todos los músculos tratados. Las muestras -RT, -ARN, AD-1, y AD-2 fueron analizadas como controles negativos para las reacciones RT-PCR. (B) El análisis de secuencia de los productos truncados generados por mONA N° 4 y N° 6 (y N° 11, no mostrado) confirmó la precisa omisión del exón 46.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Ya que el exón 45 es uno de los exones que son deletados con más frecuencia en DMD, al principio los inventores se dirigieron a la inducción de la omisión específica del exón 46 (Fig. 1). Esto produciría una distrofina, en gran parte funcional, más corta encontrada en pacientes con DMB que llevan una delección de los exones 45 y 46. El sistema fue al principio establecido para la modulación del empalme de pre-mARN de distrofina del gen de distrofina de ratón. Más tarde, los inventores aspiraron a trabajar con el gen de distrofina humano con la intención de restaurar el marco de lectura de translación y la síntesis de distrofina en células de músculo de pacientes afectados con DMD por una delección del exón 45.

Diseño de los rONA y hONA

Fue diseñada una serie de ONA específicos de ratón y humano (rONA y hONA), dirigida a una parte interna del exón 46 que contiene una extensión de secuencias ricas en purina y que se supone que tienen un supuesto papel regulador en el proceso de empalme del exón 46 (Fig. 2). Para el rastreo inicial de los ONA en los ensayos de cambio de movilidad de gel (véase más abajo), los inventores usaron oligonucleótidos de ADN no modificados (sintetizados por EuroGentec, Bélgica). Para los experimentos de transfección real en células de músculo, los inventores usaron oligo-ribonucleótidos de 2'-O-metilo-fosforotioato (también sintetizado por EuroGentec, Bélgica). Éstos oligonucleótidos de ARN modificados son conocidos por ser resistentes a las endonucleasas y RNasaH, y por unirse al ARN con afinidad alta. Las secuencias de aquellos ONA que fueron eficaces finalmente y que fueron aplicados en células de músculo *in vitro* son mostradas más abajo. Los ONA correspondientes específicos de ratón y humano son muy homólogos, pero no completamente idénticos.

El listado de más abajo se refiere a la forma desoxi usada para las pruebas, en los ribonucleótidos 2-O-metilo usados finalmente todas las T deberían ser leídas como U.

mONA N° 2: 5'GCAATGTTATCTGCTT

mONA N° 3: 5'GTTATCTGCTTCTTCC

mONA N° 4: 5'CTGCTTCTTCCAGCC

mONA N° 5: 5'TCTGCTTCTTCCAGC

mONA N° 6: 5'GTTATCTGCTTCTTCCAGCC

mONA N° 7: 5'CTTTTAGCTGCTGCTC

mONA N° 8: 5'GTTGTTCTTTTAGCTGCTGC

mONA N° 9: 5'TTAGCTGCTGCTCAT

mONA N° 10: 5'TTTAGCTGCTGCTCATCTCC

mONA N° 11: 5'CTGCTGCTCATCTCC

hONA N° 4: 5'CTGCTTCCTCCAACC

hONA N° 6: 5'GTTATCTGCTTCCTCCAACC

hONA N° 8: 5'GCTTTTCTTTTAGTTGCTGC

hONA N° 9: 5'TTAGTTGCTGCTCTT

hONA N° 11: 5'TTGCTGCTCTTTTCC

Ensayos de cambio de movilidad de gel

La eficacia de los ONA es determinada por su afinidad de unión a la secuencia diana. No obstante, sin las recientes mejoras de los programas de simulación informática para la predicción del plegado del ARN, es difícil especular cuál de los ONA diseñados sería capaz de unirse a la secuencia diana con una afinidad relativamente alta. Por lo tanto, los inventores realizaron ensayos de cambio de movilidad de gel (según los protocolos descritos por Bruice *et al.*, 1997). El fragmento de ARN diana del exón 46 fue generado por la T7-transcripción *in vitro* a partir de un fragmento de la PCR (amplificado a partir de mARN de músculo murino o humano utilizando un cebador sentido que contiene

la secuencia del promotor T7) en presencia de 32P-CTP. La afinidad de unión de los ONA individuales (0,5 pmol) para los fragmentos de transcripción diana fue determinada por hibridación a 37°C durante 30 minutos y la subsecuente electroforesis con gel de poliacrilamida (del 8 %). Los inventores realizaron estos ensayos para el rastreo de los ONA específicos tanto de ratón como de humano (Fig. 3). Al menos 5 ONA específicos de ratón diferentes (mONA N° 4, 6, 8, 9 y 11) y cuatro ONA específicos de humano correspondientes (hONA N° 4, 6, 8 y 9) generaron un cambio de movilidad, demostrando su afinidad de unión para el ARN diana.

Transfección en cultivos de célula de músculo

Fueron seleccionados los ONA específicos del exón 46 que mostraron la afinidad de unión diana más alta en ensayos de cambio de movilidad de gel para el análisis de su eficacia en la inducción de la omisión en células de músculo *in vitro*. En todos los experimentos de transfección, los inventores incluyeron un ONA no específico como un control negativo para la omisión específica del exón 46. Como se menciona, el sistema se construyó primero en células de músculo de ratón. Los inventores usaron tanto cultivos de mioblastos proliferantes como de miotubos postmitóticos (expresión de niveles más altos de distrofina) derivados de la línea celular de músculo de ratón C2C12. Para los experimentos subsecuentes en cultivos de célula de músculo derivadas de humano, los inventores usaron cultivos de célula de músculo primarios aislados de biopsias de músculo de un individuo no afectado y dos pacientes con DMD no relacionados que llevaban una delección del exón 45. Estos cultivos heterogéneos contenían aproximadamente el 20-40 % de células miogénicas. Fueron transfectados los diferentes ONA (a una concentración de 1 µM) en las células usando el polímero catiónico PEI (MBI Fermentas) a una proporción equivalente de 3. Los ONA transfectados en estos experimentos contenían un grupo 5'-fluoresceína lo que permitió a los inventores determinar las eficiencias de la transfección contando el número de núcleos fluorescentes. Típicamente, más del 60 % de células mostraron un consumo nuclear específico de los ONA. Para facilitar el análisis RT-PCR, el ARN fue aislado 24 horas después de la transfección usando ARNzol B (CamPro Scientific, Países Bajos).

RT-PCR y análisis de secuencia

El ARN fue retro-transcrito usando la polimerasa de *C. therm.* (Roche) y un cebador inverso específico del exón 48. Para facilitar la detección de la omisión del exón 46 de distrofina, el cDNA fue amplificado por dos rondas de la PCR, incluyendo una amplificación anidada usando cebadores en los exones 44 y 47 (para el sistema humano), o los exones 45 y 47 (para el sistema de ratón). En los cultivos de células de mioblasto y miotubo de ratón, los inventores detectaron un producto truncado del cual el tamaño correspondió al exón 45 directamente empalmado al exón 47 (Fig. 4). El análisis de secuencia subsecuente confirmó la omisión específica del exón 46 de éstos transcritos de distrofina de ratón. La eficacia de la omisión del exón fue diferente para los ONA individuales, mostrando mONA N° 4 y N° 11 las eficiencias más altas. Siguiendo estos resultados prometedores, los inventores se concentraron en la inducción de una modulación similar del empalme de distrofina en los cultivos de célula de músculo derivadas de humano. En consecuencia, los inventores detectaron un producto truncado en las células de músculo control, correspondiente al exón 45 empalmado al exón 47. De forma interesante, en las células de músculo derivadas del paciente fue detectado un fragmento más corto que consistía en el exón 44 empalmado al exón 47. La omisión específica del exón 46 de las transcripciones de distrofina humanas fue confirmada por los datos de secuencia. Esta modulación de empalme tanto del transcrito de distrofina de ratón y humano no fue ni observada en los cultivos de célula no transfectadas, ni en los cultivos transfectados con un ONA no específico.

Análisis inmunohistoquímico

Los inventores intentaron inducir la omisión del exón 46 en células de músculo de pacientes que llevaban una delección del exón 45, a fin de restaurar la traducción y la síntesis de una proteína de distrofina. Para detectar un producto de distrofina en la transfección con hONA N° 8, los dos cultivos de célula de músculo derivadas del paciente fueron sometidos a inmunocitoquímica usando dos anticuerpos monoclonales de distrofina diferentes (Mandys-1 y Dys2) generados contra los dominios de la proteína de distrofina localizados cerca y lejos de la región diana respectivamente. El análisis fluorescente reveló la restauración de la síntesis de distrofina en ambos cultivos de célula derivadas del paciente (Fig. 5). Aproximadamente al menos el 80 % de las fibras se tiñeron positivamente con distrofina en las muestras tratadas.

Los resultados de los inventores muestran, por primera vez, la restauración de la síntesis de distrofina del gen de DMD endógeno en células de músculo de pacientes con DMD. Esto es una prueba del principio de viabilidad de la modulación de reconocimiento del empalme de pre-mARN de distrofina con objetivos terapéuticos.

La omisión de reconocimiento del exón 51

Omisión simultánea de exones de distrofina

La omisión de reconocimiento del exón 51. Los inventores demostraron la viabilidad de la modulación mediada por ONA del empalme del exón 46 de distrofina, en células de músculo de ratón y humanas *in vitro*. Estas conclusiones garantizaron otros estudios para evaluar los ONA como agentes terapéuticos para DMD. Ya que la mayor parte de las delecciones que causan DMD están agrupadas en dos puntos calientes de mutación, la omisión de reconocimiento de un exón particular puede restaurar el marco de lectura en serie de pacientes con mutaciones

diferentes (véase la tabla 1). El exón 51 es un interesante exón diana. La omisión de este exón es terapéuticamente aplicable en pacientes que llevan delecciones que atraviesan el exón 50, los exones 45-50, exones 48-50, exones 49-50, exón 52, y los exones 52-63, que incluye un total del 15 % de pacientes de la base de datos de los inventores de Leiden.

5 Los inventores diseñaron una serie de diez ONA específicos humanos (hONA N° 21-30, véase más abajo) dirigidos a diferentes regiones ricas en purina dentro del exón 51 de distrofina. Estas extensiones ricas en purina sugirieron la presencia de un supuesto elemento regulador del empalme del exón que los inventores pretendieron bloquear a fin de inducir la eliminación de tal exón durante el proceso de empalme. Todos los experimentos fueron realizados según los protocolos que se describen para omitir el exón 46 (véase más arriba). Los ensayos de cambio de
10 movilidad de gel fueron realizados para identificar a aquellos hONA con una afinidad de unión alta para el ARN diana. Los inventores seleccionaron cinco hONA que mostraron la afinidad más alta. Estos hONA fueron transfectados en cultivos de célula de músculo control humanas a fin de probar la viabilidad de la omisión del exón 51 *in vitro*. El ARN fue aislado 24 horas después de la transfección, y el cDNA fue generado usando un cebador inverso específico del exón 53 ó 65. La amplificación PCR de la región diana fue realizada usando diferentes combinaciones del cebador flanqueante al exón 51. La RT-PCR y el análisis de secuencia revelaron que los
15 inventores fueron capaces de inducir la omisión específica del exón 51 de la transcripción de distrofina humana. Posteriormente los inventores transfectaron dos hONA (N° 23 en 29) que se mostraron que eran capaces de inducir la omisión del exón en seis cultivos de célula de músculo diferentes derivados de pacientes con DMD que llevaban una de las mutaciones mencionadas anteriormente. La omisión del exón 51 en estos cultivos fue confirmada por RT-PCR y análisis de secuencia (Fig. 7). Lo que es más importante, el análisis inmunohistoquímico, usando anticuerpos múltiples generados contra diferentes partes de la proteína distrofina, mostró en todos los casos que, debido a la omisión del exón 51, la síntesis de una proteína de distrofina fue restaurada.

hONA específicos del exón 51:

25 hONA N° 21: 5'CCACAGGTTGTGTCACCAG
hONA N° 22: 5'TTTCCTTAGTAACCACAGGTT
hONA N° 23: 5'TGGCATTCTAGTTTGG
hONA N° 24: 5'CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC
hONA N° 25: 5'GGTAAGTTCTGTCCAAGCCC
30 hONA N° 26: 5'TCACCCCTCTGTGATTTTAT
hONA N° 27: 5'CCCTCTGTGATTTT
hONA N° 28: 5'TCACCCACCATCACCT
hONA N° 29: 5'TGATATCCTCAAGGTCACCC
hONA N° 30: 5'CTGCTTGATGATCATCTCGTT

35 Omisión simultánea de exones de distrofina múltiples.

La omisión de un exón adicional, tal como el exón 46 o el exón 51, restaura el marco de lectura para un número considerable de diferentes mutaciones de DMD. El rango de mutaciones para las cuales esta estrategia es aplicable puede ser ampliado por la omisión simultánea de más de un exón. Por ejemplo, en pacientes con DMD con una
40 delección del exón 46 al exón 50, sólo la omisión tanto de los exones flanqueantes de delección 45 y 51 permite el reestablecimiento del marco de lectura de translación.

Omisión del exón independiente de SER (Ejemplo de Referencia).

Una mutación en el exón 29 conduce a la omisión de este exón en dos pacientes con distrofia muscular de Becker (Ginjaar *et al.*, 2000; *EJHG*, volumen 8, p. 793-796). Los inventores estudiaron la viabilidad de dirigir la omisión del
45 exón 29 por el reconocimiento del sitio de la mutación por los ONA. La mutación se localiza en una extensión rica en purina que podría estar asociada a la actividad de SRE. Los inventores diseñaron una serie de ONA (véase más abajo) dirigidos a secuencias ambas dentro (de h29ONA N° 1 a h29ONA N° 6) y fuera (de h29ONA N° 7 a h29ONA N° 11) de la supuesta SRE. Los ensayos de cambio de movilidad de gel fueron realizados (como se describe) para identificar a los ONA con afinidad más alta para el ARN diana (Fig. 8). Posteriormente, fueron transfectados h29ONA
50 N° 1, N° 2, N° 4, N° 6, N° 9, N° 10 y N° 11 en cultivos de miotubo humano control usando el reactivo de transfección PEI. El ARN fue aislado 24 horas después de la transfección, y el cDNA fue generado usando un cebador inverso

específico del exón 31. La amplificación PCR de la región diana fue realizada usando diferentes combinaciones de cebador flanqueante al exón 29. Esta RT-PCR y el análisis de secuencia subsecuente (Fig. 8 B, C) revelaron que los inventores eran capaces de inducir la omisión del exón 29 del transcrito de distrofina humana. Sin embargo, los ONA que facilitaron esta omisión fueron dirigidos a secuencias tanto dentro como fuera de las supuestas SRE (h29ONA N° 1, N° 2, N° 4, N° 6, N° 9 y N° 11). Estos resultados sugieren que la omisión del exón 29 ocurre independientemente de si el exón 29 contiene una SRE y que por lo tanto la unión de los ONA al exón 29 inactivaba lo más probablemente una señal de inclusión del exón que una SRE. Esta prueba de la omisión del exón independiente de SRE puede ampliar la aplicabilidad global de esta terapia a exones sin las SRE.

10 h29ONA N° 1: 5'TATCCTCTGAATGTGCGCATC

h29ONA N° 2: 5'GGTTATCCTCTGAATGTGCGC

h29ONA N° 3: 5'TCTGTTAGGGTCTGTGCC

h29ONA N° 4: 5'CCATCTGTTAGGGTCTGTG

h29ONA N° 5: 5'GTCTGTGCCAATATGCG

15 h29ONA N° 6: 5'TCTGTGCCAATATGCGAATC

h29ONA N° 7: 5'TGTCTCAAGTTCCTC

h29ONA N° 8: 5'GAATTAAATGTCTCAAGTTC

h29ONA N° 9: 5'TTAAATGTCTCAAGTTCC

20 h29ONA N° 10: 5'GTAGTTCCTCCAACG

h29ONA N° 11: 5'CATGTAGTTCCTCC

Omisión del exón 46 inducido por ONA *in vivo* en tejido de músculo murino.

Después de los prometedores resultados en células de músculo cultivadas, los inventores probaron los diferentes ONA específicos del exón 46 de distrofina de ratón *in vivo* inyectándolos, unidos a polietilenimina (PEI), en los músculos gemelos de la pierna de ratones control. Con mONA N° 4, N° 6 y N° 11, previamente se mostró que eran eficaces en células de músculo de ratón *in vitro*, los inventores fueron capaces de inducir la omisión del exón 46 en el tejido de músculo *in vivo* como se determina tanto por RT-PCR como por análisis de secuencia (Fig. 9). La omisión del exón 46 *in vivo* era dependiente de la dosis siendo la eficiencia más alta (hasta el 10 %) después de la inyección de 20 µg por músculo por día durante dos días subsecuentes.

Referencias

Achse et al., 1996; *J. Biochem.* **120**; p. 53-60.

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

Brunak et al., 1991; *J Mol Biol* **220**: p. 49-65.

35 Dunckley, MG. et al. (1998) *Human molecular genetics* **7**: páginas 1083-1090.

Ginjaar et al., 2000; *EJHG*, volumen 8, p. 793-796

Mann et al., 2001; *PNAS*, volumen **98**, páginas 42-47

Tanaka et al., 1994 *Mol Cell Biol.* **14**: p. 1347-1354.

Wilton SD et al. (1999) *Neuromuscular disorders* **9**: páginas 330-338.

40

Los detalles y antecedentes de la Distrofia Muscular de Duchenne y las enfermedades relacionadas pueden ser encontrados en el sitio Web <http://www.dmd.nl>

Tabla 1

Exón que se omite	Terapéutica para deleciones de DMD-(exones)	Frecuencia en http://www.dmd.nl (%)
2	3-7	2
8	3-7	4
	4-7	
	5-7	
	6-7	
43	44	5
	44-47	
44	35-43	8
	45	
	45-54	
45	18-44	13
	46-47	
	44	
	46-48	
	46-49	
	46-51	
	46-53	
46	45	7
50	51	5
	51-55	
51	50	15
	45-50	
	48-50	
	49-50	
	52	
	52-63	
52	51	3
	53	
	53-55	
53	45-52	9
	48-52	
	49-52	
	50-52	
	52	

REIVINDICACIONES

1. Uso de un oligonucleótido antisentido dirigido contra el interior del exón 46 ó 51 en un pre-mARN de distrofina, en el que dicho oligonucleótido antisentido es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento de exón en dicho exón y contiene entre 14-40 nucleótidos, para la preparación de un medicamento para dirigir el empalme de dicho pre-mARN de distrofina en una célula capaz de realizar una operación de empalme.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de reconocimiento del exón está presente en un exón que comprende un par donador/aceptador de empalme fuerte.
3. El uso de un oligonucleótido antisentido dirigido contra el interior del exón 46 ó 51 en un pre-mARN de distrofina, en el que dicho oligonucleótido antisentido es capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón en dicho exón y contiene entre 14-40 nucleótidos, para producir una proteína de distrofina mutante o normal.
4. El uso según la reivindicación 3, en el que dicha proteína de distrofina mutante es equivalente a una proteína de distrofina de un paciente de Becker.
5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho oligonucleótido antisentido contiene entre 15-25 nucleótidos o su equivalente funcional capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento del exón en dicho exón.
6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además el uso de otro oligonucleótido antisentido capaz de inhibir una secuencia de reconocimiento del exón presente en otro exón de dicho pre-mARN y que contiene entre 14-40 nucleótidos para la preparación de un medicamento para dirigir el empalme de dicho pre-mARN de distrofina.
7. Un método para dirigir el empalme de un pre-mARN de distrofina en una célula capaz de realizar una operación de empalme que comprende poner en contacto dicho pre-mARN de distrofina en dicha célula *in vitro* con un oligonucleótido antisentido capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento de exón del exón 46 ó 51 en dicho pre-mARN de distrofina, conteniendo dicho oligonucleótido entre 14-40 nucleótidos, comprendiendo dicho método además permitir el empalme de dicho pre-mARN.
8. Un método según la reivindicación 7, que comprende además permitir la traducción del mRNA producido a partir del empalme de dicho pre-mARN.
9. Un método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que dicho mRNA codifica una proteína funcional.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que dicha puesta en contacto causa la activación de un sitio de empalme críptico en un exón puesto en contacto.
11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que dicha secuencia de reconocimiento del exón está presente en un exón que comprende un par donador/aceptador de empalme fuerte.
12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que dicha traducción causa una proteína de distrofina mutante o normal.
13. Un método según la reivindicación 12, en el que dicha proteína de distrofina mutante es equivalente a una proteína de distrofina de un paciente de Becker.
14. Un método según la reivindicación 13, en el que dicho oligonucleótido antisentido comprende entre 15-25 nucleótidos o su equivalente funcional capaz de inhibir expresamente una secuencia de reconocimiento de exón en dicho exón.
15. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-14, que comprende además proporcionar dicha célula *in vitro* con otro oligonucleótido antisentido capaz de inhibir una secuencia de reconocimiento de exón presente en otro exón de dicho pre-mARN.
16. Un oligonucleótido antisentido de entre 14-40 nucleótidos que comprende la secuencia de ácidos nucleicos:

hONA Nº 4:	5' CTGCTTCCTCCAACC,
hONA Nº 6:	5' GTTATCTGCTTCCTCCAACC,
hONA Nº 8:	5' GCTTTTCTTTTAGTTGCTGC,
hONA Nº 9:	5' TTAGTTGCTGCTCTT,
hONA Nº 11:	5' TTGCTGCTCTTTTCC,

hONA N° 21: 5' CCACAGGTTGTGTCACCAG,
hONA N° 22: 5' TTTCCTTAGTAACCACAGGTT,
hONA N° 23: 5' TGGCATTCTAGTTTGG,
hONA N° 24: 5' CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC,
5 hONA N° 25: 5' GGTAAGTTCTGTCCAAGCCC,
hONA N° 26: 5' TCACCCTCTGTGATTTTAT,
hONA N° 27: 5' CCCTCTGTGATTTT,
hONA N° 28: 5' TCACCCACCATCACCT, o
hONA N° 30: 5' CTGCTTGATGATCATCTCGTT.

10

17. Un vehículo de administración de ácidos nucleicos que comprende un oligonucleótido antisentido capaz de inhibir una secuencia de reconocimiento de exón en al menos uno de los exones 46 ó 51 de un pre-mARN de distrofina conteniendo dicho oligonucleótido entre 14-40 nucleótidos, o el complemento de dicho oligonucleótido.

15

18. Un vehículo de administración de ácidos nucleicos capaz de expresar un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 16.

19. Un vehículo de administración de ácidos nucleicos según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, que comprende un virus monocatenario.

20. Un vehículo de administración de ácidos nucleicos según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, que comprende un virus adeno-asociado.

20

21. Uso de un oligonucleótido antisentido capaz de inhibir una secuencia de reconocimiento de exón en al menos uno de los exones 46 ó 51 de un pre-mARN de distrofina, conteniendo dicho oligonucleótido entre 14-40 nucleótidos o un vehículo de administración de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, para la preparación de un medicamento.

25

22. Uso de un oligonucleótido antisentido capaz de inhibir una secuencia de reconocimiento de exón en al menos uno de los exones 46 ó 51 de un pre-mARN de distrofina, conteniendo dicho oligonucleótido entre 14-40 nucleótidos o un vehículo de administración de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 17-20, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad heredada.

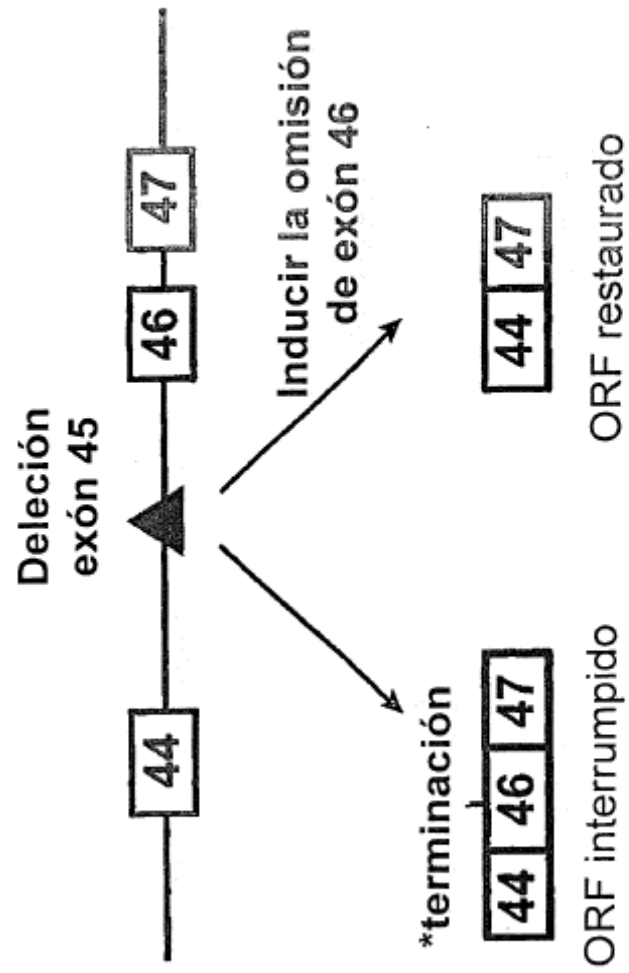
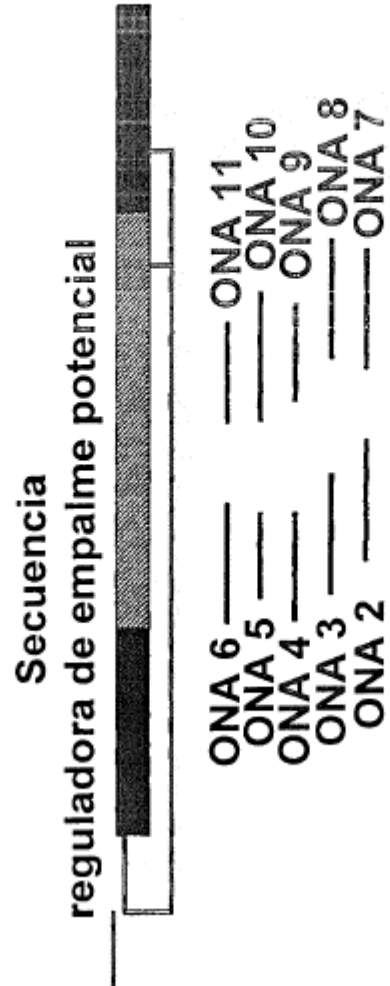


Fig. 1

Exón 46 de distrofina



ONA: oligo-ribonucleótido antisentido
 1) ARN de 2' O-metil-fosforotioato
 2) grupo 5' fluoresceína

Fig.2

Fig. 3

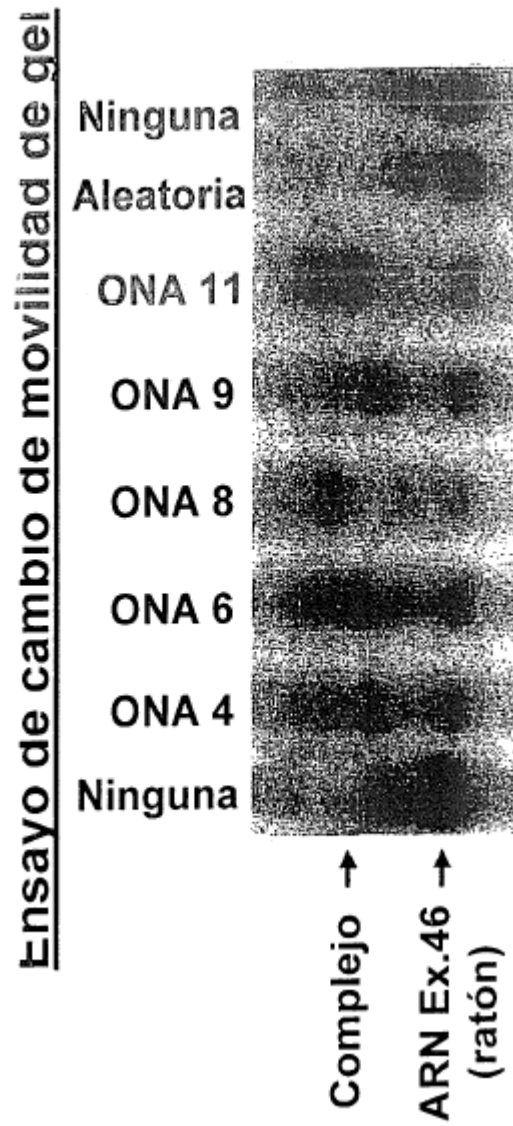


Fig. 4

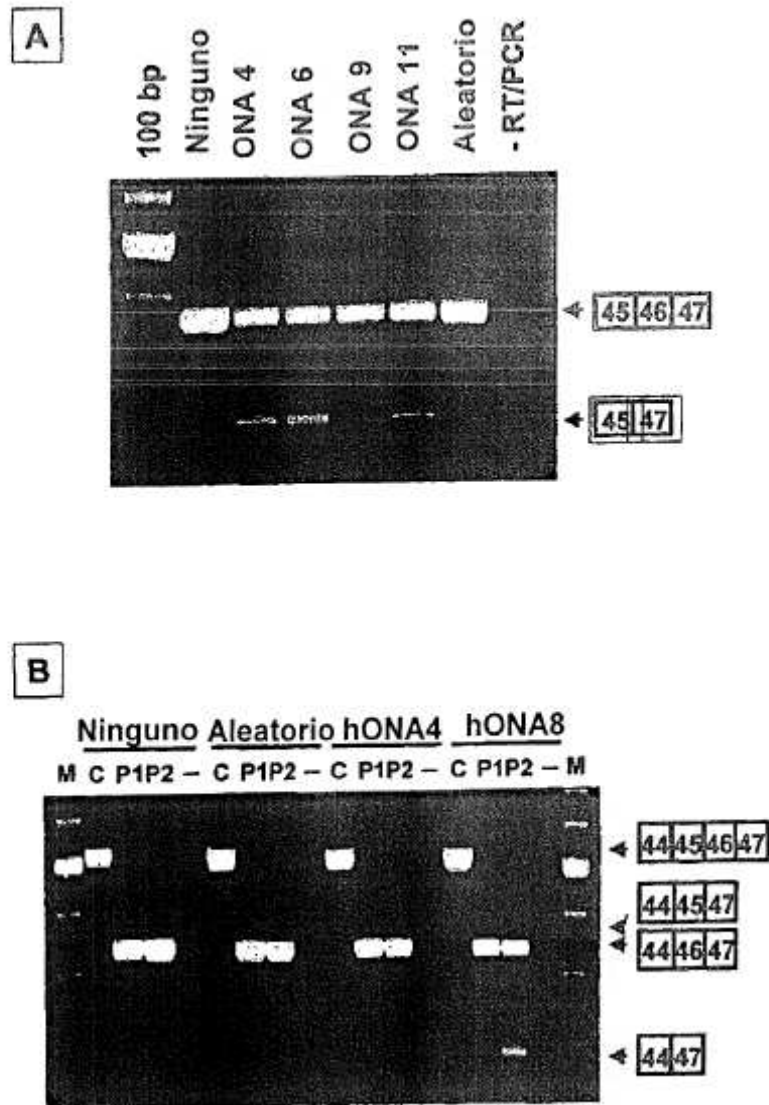


Fig. 5

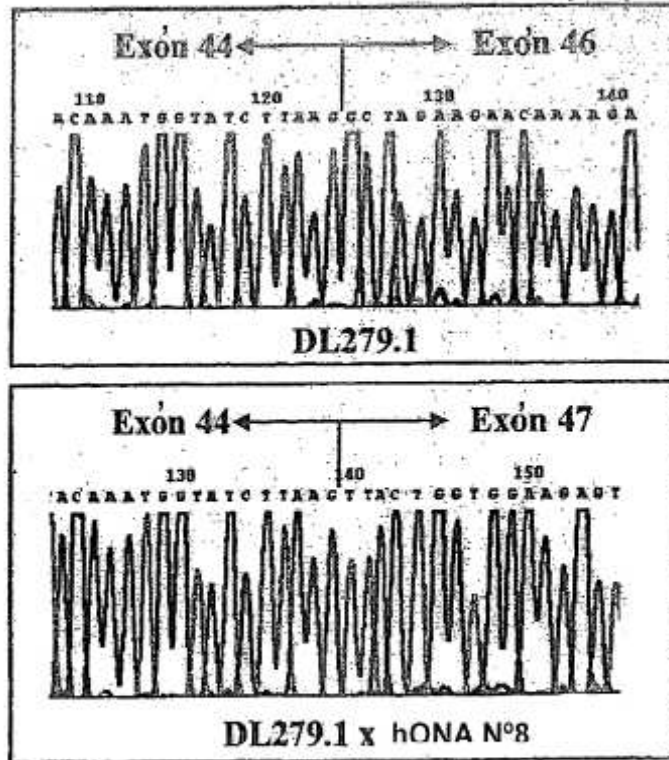
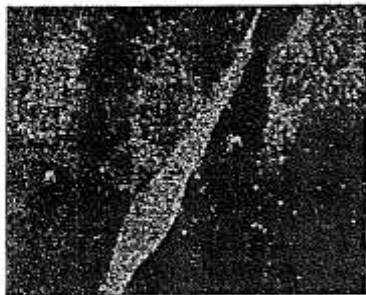
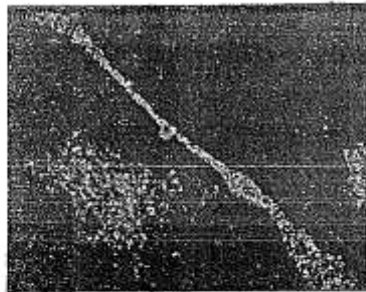


Fig. 6

distrofina
(ex.31-32)

distrofina
(ex.77-79)



DL279.1 x ONA N°8



DL279.1

Fig. 7

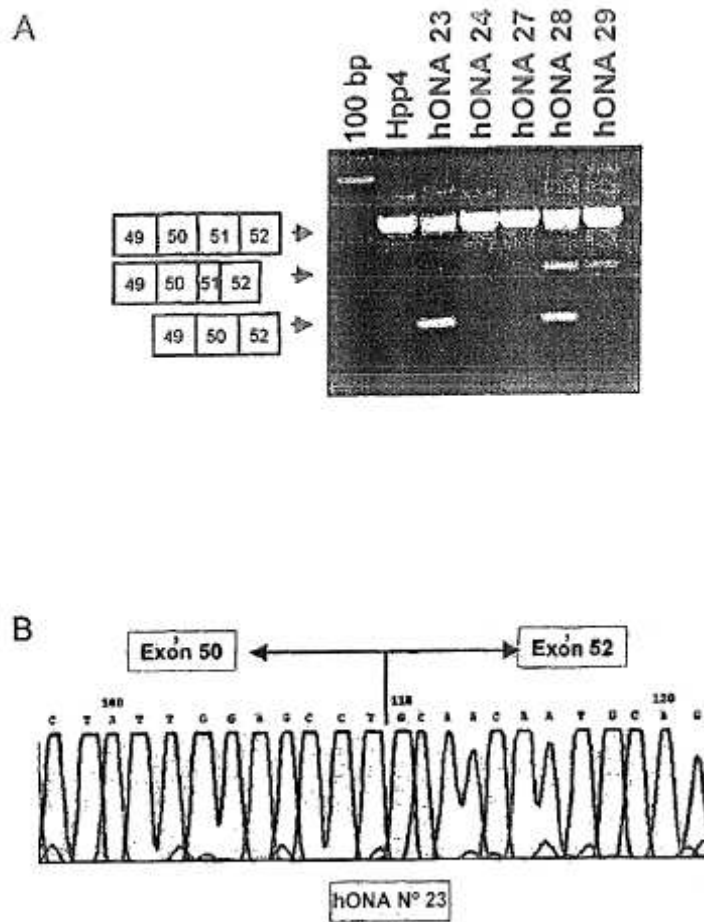


Fig. 8A

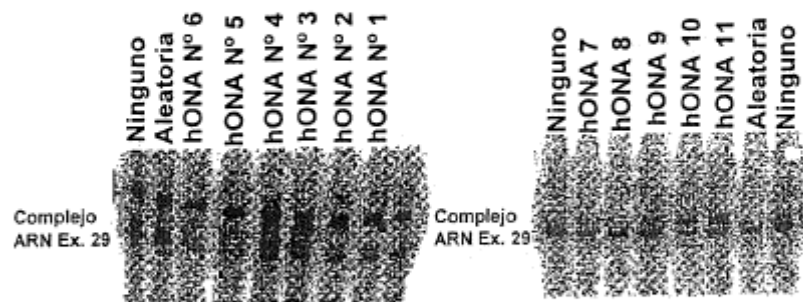


Fig. 8B

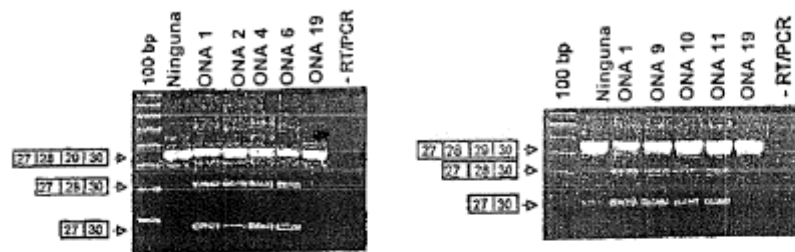
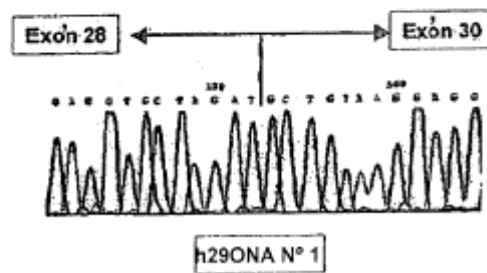


Fig. 8C



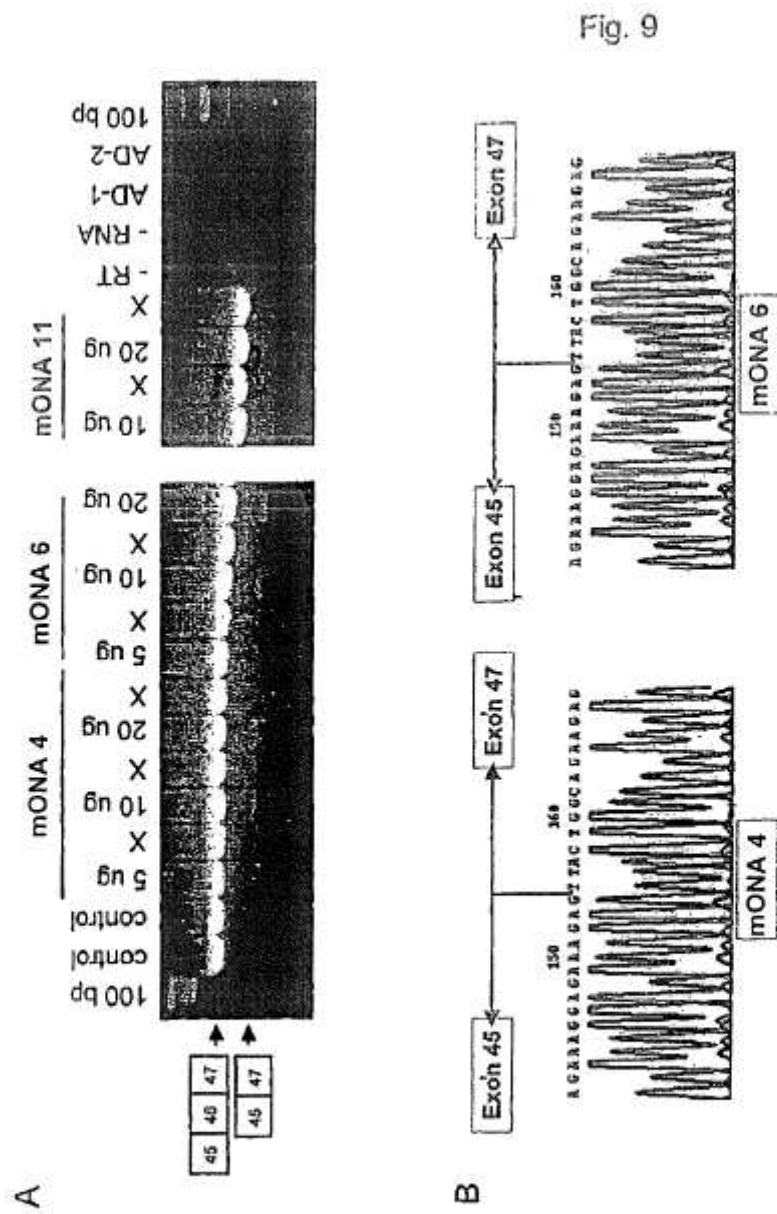


Fig. 9