

(11) Número de Publicação: **PT 698092 E**

(51) Classificação Internacional:

**C12N 15/11** (2006.01) **A61K 31/70** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01) **C12N 15/67** (2006.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>1994.05.10</b>	(73) Titular(es): <b>THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL 200 BYNUM HALL CAMPUS BOX 4100 CHAPEL HILL, NC 27599-4100</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>1993.05.11 US 62471</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>1996.02.28</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2007.07.25 110/2007</b>	(72) Inventor(es): <b>RYSZARD KOLE</b> <b>US</b> <b>ZBIGNIEW DOMINSKI</b> <b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b> <b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **OLIGONUCLEÓTIDOS COMPLEMENTARES DE UMA CADEIA CODIFICADORA QUE COMBATEM SPLICING ABERRANTE E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

OLIGONUCLEÓTIDOS COMPLEMENTARES DE UMA CADEIA CODIFICADORA QUE COMBATEM SPLICING ABERRANTE E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO

**RESUMO****"OLIGONUCLEÓTIDOS COMPLEMENTARES DE UMA CADEIA  
CODIFICADORA QUE COMBATEM "SPLICING" ABERRANTE  
E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO"**

Descrive-se um método para combater "splicing" aberrante numa molécula de pré-mRNA contendo uma mutação. Quando presente no pré-mRNA, a mutação faz com que o pré-mRNA seja incorrectamente processado e produza um mRNA ou fragmento de mRNA aberrante, diferente do mRNA normalmente codificado pelo pré-mRNA. O método caracteriza-se pela hibridação de um oligonucleótido complementar da sequência codificadora com a molécula de pré-mRNA, para criar uma molécula de cadeia dupla em condições que permitem o "splicing". O oligonucleótido complementar da sequência codificadora não activa a RNase H e é seleccionado para bloquear um membro da série aberrante de elementos de "splicing", criados pela mutação, para que o intrão nativo seja removido por "splicing" e seja produzida a primeira molécula de mRNA codificadora de uma proteína nativa. São também descritos oligonucleótidos úteis para a execução do método.

**DESCRIÇÃO****"OLIGONUCLEÓTIDOS COMPLEMENTARES DE UMA CADEIA  
CODIFICADORA QUE COMBATEM "SPLICING" ABERRANTE  
E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO"**Campo do invento

O presente invento está relacionado com medicamentos para combater "splicing" aberrante de moléculas de pré-mRNA e regular positivamente a expressão génica e com oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras úteis para a realização do mesmo.

Fundamento do Invento

O potencial dos oligonucleótidos como moduladores da expressão génica está, actualmente, sob intensa investigação. A maioria dos esforços tem-se focado na inibição da expressão de genes alvo, tais como oncogenes ou genes virais. Os oligonucleótidos são dirigidos contra RNA (oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras) (M. Ghosh and J. Cohen, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 42, 79 (1992); L. Neckers et al., Crit. Rev. Oncog. 3, 175 (1992)) ou contra DNA onde formem estruturas de tripla hélice inibindo a transcrição por polimerase de RNA II (J. Hanvey et al., Science 258,1481 (1992); W. McShan et al.,

J. Biol. Chem. 267, 5712 (1992); M. Grigoriev et al., J.l-Valentin et al., Biol. Chem. 267, 3389 (1992); G. Duval-Valentin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 504 (1992)). Para se conseguir o efeito pretendido, os oligonucleótidos devem promover um decaimento da proteína indesejável pré-existente, inibindo eficazmente a sua formação de novo. Tais técnicas não são úteis quando o objectivo é regular positivamente a produção da proteína nativa. Ainda, nos casos em que a expressão de um gene é regulada negativamente devido a mutações, será extremamente útil um meio de regular positivamente a expressão do gene através de tecnologia de moléculas complementares da sequência codificadora.

#### Sumário do Invento

O presente invento proporciona meios para utilização de oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras para regular positivamente a expressão de um DNA contendo uma mutação, que de outra forma conduziria à regulação negativa daquele gene através de "splicing" aberrante do pré-mRNA codificado.

Assim, num primeiro aspecto do presente invento é proporcionado um medicamento para combater "splicing" aberrante numa molécula de pré-mRNA contendo uma mutação. Quando presente no pré-mRNA, a mutação provoca o "splicing" incorrecto do pré-mRNA e produz um mRNA aberrante ou fragmento de mRNA diferente do mRNA normalmente resultante

do pré-mRNA. Mais particularmente, a molécula de pré-mRNA possui: (i) uma primeira série de elementos de "splicing" que definem um intrão nativo, o qual é removido por "splicing" quando a mutação está ausente, para produzir uma primeira molécula de mRNA codificadora de uma proteína nativa, e (ii) uma segunda série de elementos de "splicing" induzidos pela mutação, a qual define um intrão aberrante diferente do intrão nativo, intrão aberrante esse que é removido por "splicing" quando a mutação está presente para produzir uma segunda molécula de mRNA aberrante diferente da primeira molécula de mRNA. O medicamento compreende um oligonucleótido capaz de hibridar com a molécula de pré-mRNA para criar uma molécula de dupla hélice em condições que permitem "splicing". O oligonucleótido complementar da sequência codificadora não activa a RNase H e é seleccionado para bloquear um membro da segunda série de elementos de "splicing" aberrantes para que o intrão nativo seja removido por "splicing" e seja produzida uma primeira molécula de mRNA codificadora de uma proteína nativa.

Num segundo aspecto do presente invento, é proporcionado um medicamento para regulação positiva da expressão de uma proteína nativa numa célula contendo um DNA codificador da proteína nativa. Esse DNA ainda possui uma mutação que causa regulação negativa da proteína nativa através do seu "splicing" aberrante. Mais particularmente, o DNA codifica um pré-mRNA, o pré-mRNA tendo as características descritas atrás. O medicamento compreende um oligonucleótido complementar de uma sequência codificadora

tendo as características atrás descritas, para que o intrão nativo seja removido por "splicing" e a proteína nativa seja produzida pela célula.

Um terceiro aspecto do presente invento é um oligonucleótido complementar da sequência codificadora útil para combater "splicing" aberrante numa molécula de pré-RNA contendo uma mutação. A molécula de pré-RNA possui uma primeira série e uma segunda série de elementos de "splicing" tendo as características atrás descritas. O oligonucleótido complementar da sequência codificadora compreende um oligonucleótido que (i) hibrida com o pré-mRNA para formar uma molécula de dupla hélice; (ii) não activa a RNase H; e (iii) bloqueia um membro da segunda série de elementos de "splicing" aberrante.

Os objectivos descritos e outros objectivos e aspectos do presente invento são discutidos detalhadamente nos desenhos apresentados e na especificação descrita abaixo.

#### Breve Descrição dos Desenhos

**Figura 1** mostra a estrutura de pré-mRNAs. Os rectângulos indicam exões; as linhas a cheio, intrões. As posições das mutações (110 e 705) relativamente ao nucleótido 1 de IVS1 e IVS2, respectivamente estão apresentadas acima do clone HBA6. Os números abaixo indicam o comprimento, em nucleótidos, de exões e intrões. Os oligonu-

cleótidos complementares de sequências codificadoras estão indicados pelas barras pequenas numeradas por baixo das construções  $\beta^{110}$  e ISV<sup>705</sup> e as vias de "splicing" pelas linhas a tracejado.

**Figura 2** mostra a reversão de "splicing" aberrante através do oligonucleótido 1 dirigido contra o ponto de ramificação normal no intrão 1 do pré-mRNA da  $\beta$ -globina. A estrutura dos produtos e intermediários está descrita à direita; o seu tamanho em nucleótidos está apresentado à esquerda. Um asterisco significa mobilidade aberrante dos intermediários contendo estruturas em laço. As mesmas designações são usadas nas figuras subsequentes. A pista 1 mostra "splicing" de pré-mRNA controlo HBA6; a pista 2 mostra "splicing" de pré-mRNA  $\beta^{110}$ ; as pistas 3-8 mostram "splicing" de pré-mRNA  $\beta^{110}$  na presença de quantidades crescentes (indicadas no topo da figura) do oligonucleótido 1; a pista 9 mostra "splicing" de pré-mRNA  $\beta^{110}$  na presença do oligonucleótido 3, tendo como alvo uma sequência no intrão 2 do pré-mRNA da  $\beta$ -globina.

**Figura 3** mostra os efeitos do oligonucleótido 2, dirigido contra o local de "splicing" 3' aberrante no intrão 1 do pré-mRNA  $\beta^{110}$ . A pista 1 mostra o "splicing" de pré-mRNA  $\beta^{110}$ ; as pistas 2-7 mostram "splicing" de pré-mRNA  $\beta^{110}$  na presença de quantidades crescentes (indicadas no topo da figura) do oligonucleótido 2.

**Figura 4** mostra a reversão de "splicing" aber-

rante do pré-mRNA ISV2<sup>705</sup> pelo oligonucleótido 3 dirigido contra o local de "splicing" 3' críptico e o oligonucleótido 4 dirigido contra o local de "splicing" 5' aberrante no intrão 2 do pré-mRNA ISV2<sup>705</sup>. A pista 1 mostra o RNA usado; as pistas 2 e 3 mostram "splicing" de transcritos controlo (indicado no topo da figura); as pistas 4-8 e 9-13 mostram "splicing" de pré-mRNA ISV2<sup>705</sup> na presença do oligonucleótido 3 e do oligonucleótido 4, respectivamente. As quantidades dos oligonucleótidos na reacção estão indicadas no topo. "?" à esquerda indica o produto de degradação aparente.

**Figura 5** ilustra os efeitos de tratamento de células ISV2-654 com um oligonucleótido complementar da sequência codificadora 2'-O-metil-ribo-oligonucleótido (17-meros) dirigido contra um local de "splicing" críptico 3' na presença do reagente de transfecção LIPOFECTIN™. Nas pistas 1, 3 e 5, RNA celular total foi sujeito a reacção de transcriptase reversa e reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR) realizadas com a sequência iniciadora A (específica para a detecção de "splicing" aberrante do pré-mRNA); nas pistas 2, 4 e 6, realizou-se RT-PCR com a sequência iniciadora C (específica para detecção de "splicing" correcto do pré-mRNA). Pré-mRNA não processado por "splicing" e os seus produtos de "splicing" correcto e aberrante estão esquematicamente ilustrados por baixo da ilustração das pistas dos géis. As pistas 1 e 2 mostram "splicing" de pré-mRNA derivado de células tratadas com o reagente de transfecção LIPOFECTIN™ e com 2'-O-metil-



oligo-ribonucleótido 3  $\mu\text{M}$ ; as pistas 3 e 4 mostram "splicing" de células tratadas com o reagente de transfecção LIPOFECTIN™ sozinho; as pistas 5 e 6 mostram "splicing" de pré-mRNA derivado de células não tratadas.

**Figura 6** é semelhante à Figura 5 atrás e mostra os efeitos de tratamento das células ISV2-654\* com oligonucleótido complementar de sequências codificadoras, 5 e 20  $\mu\text{M}$ , dirigido contra o local de "splicing" críptico 3' na presença de partículas de adenovírus deficientes para a replicação. A reacção de RT-PCR foi realizada usando sequências iniciadoras que hibridam com o segundo e o terceiro exões do gene da  $\beta$ -globina humana, respectivamente. A pista 1 mostra "splicing" de pré-mRNA derivado de células não tratadas. As pistas 2 e 3 mostram "splicing" de pré-mRNA derivado de células tratadas com oligonucleótido 5 e 20  $\mu\text{M}$ , respectivamente, na presença do adenovírus.

**Figura 7** é semelhante à Figura 5 atrás e mostra os efeitos de electroporação de células ISV2-654\* tratadas com 5 ou 50  $\mu\text{M}$  de oligonucleótido complementar de sequências codificadoras 2'-o-metil-ribo-oligonucleótido dirigido contra um local de "splicing" 5' aberrante. A pista 1 mostra "splicing" de pré-mRNA derivado de células não tratadas. As pistas 2 e 3 mostram "splicing" de pré-mRNA de células tratadas com 5 e 50  $\mu\text{M}$  do oligonucleótido, respectivamente.

Descrição Detalhada do Invento

Os intrões são fragmentos de DNA eucariótico inseridos entre as sequências codificadoras, ou "exões", desse DNA. Os intrões e exões são transcritos no RNA designado "transcrito primário precursor do mRNA" (ou pré-mRNA). Os intrões devem ser removidos do pré-mRNA para que a proteína nativa codificada pelos exões possa ser produzida (o termo "proteína nativa" como aqui usado refere-se à proteína natural, selvagem ou funcional). A remoção dos intrões do pré-mRNA e subsequente ligação dos exões são realizadas no processo de "splicing".

O processo de "splicing" é de facto uma série de reacções, mediadas por factores de "splicing", que são realizadas no RNA após transcrição mas antes da tradução. Assim, um "pré-mRNA" é um RNA que possui exões e um ou mais intrões e um "mRNA" é um RNA em que um ou mais intrões foram removidos e os exões ligados uns aos outros sequencialmente de forma a que a proteína possa ser traduzida a partir deles pelos ribossomas.

Os intrões são definidos por uma série de "elementos de "splicing"" que são segmentos de RNA conservados, relativamente curtos, que ligam os vários factores de "splicing" que efectuem as reacções de "splicing". Assim, cada intrão é definido por um local de "splicing" 5' e um local de "splicing" 3' e um ponto de ramificação situado entre eles. Estes elementos de "splicing" são

"bloqueados", como aqui discutido, quando um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras se sobrepõe totalmente ou parcialmente com o elemento ou se liga ao pré-mRNA numa posição suficientemente perto do elemento para destruir a ligação e função dos factores de "splicing" que naturalmente mediarão a reacção de "splicing" particular, a qual ocorre nesse elemento (e.g., liga-se ao pré-mRNA numa posição dentro de 3, 6, 9, 12, 15 ou 18 nucleótidos do elemento a ser bloqueado).

A mutação no DNA nativo e pré-mRNA pode ser uma mutação de substituição ou uma mutação de deleção que cria um novo elemento de "splicing" aberrante. O elemento de "splicing" aberrante é assim um membro de uma série de elementos de "splicing" aberrantes que definem um intrão aberrante. Os restantes membros da série de elementos de "splicing" aberrantes podem também ser membros da série de elementos de "splicing" que definem o intrão nativo. Por exemplo, se a mutação criar um novo local de "splicing" 3' aberrante que está a montante do local de "splicing" 3' nativo e a jusante do ponto de ramificação nativo (i.e., 3' relativamente a ele), então o local de "splicing" 5' nativo e o ponto de ramificação nativo podem servir como membros da série de elementos de "splicing" nativos e da série de elementos de "splicing" aberrantes. Noutras situações, a mutação pode fazer com que regiões nativas do RNA, normalmente dormentes ou que não desempenham um papel como elementos de "splicing", fiquem activadas e sirvam como elementos de "splicing". Tais elementos são referidos como

elementos "crípticos". Por exemplo, se a mutação criar um novo local de "splicing" 3' alterado aberrante que esteja situado entre o local de "splicing" 3' nativo e o ponto de ramificação, pode activar um ponto de ramificação críptico entre o local de "splicing" 3' alterado aberrante e o ponto de ramificação nativo. Noutras situações, uma mutação pode criar um local de "splicing" 5' aberrante situado entre o ponto de ramificação nativo e o local de "splicing" 5' nativo e pode ainda activar um local de "splicing" 3' críptico e um ponto de ramificação críptico sequencialmente a montante do local de "splicing" 5' alterado aberrante. Nesta situação, o intrão nativo fica dividido em dois intrões aberrantes, com um novo exão situado entre eles. Ainda, nalgumas situações em que um elemento de "splicing" nativo (particularmente um ponto de ramificação) é igualmente um membro da série de elementos de "splicing" aberrantes, pode ser possível bloquear o elemento nativo e activar um elemento críptico (*i.e.*, um ponto de ramificação críptico) que recrutará os restantes membros da série nativa de elementos de "splicing" para forçar o "splicing" correcto relativamente ao "splicing" incorrecto. Note-se ainda que, quando um elemento de "splicing" críptico é activado, pode estar situado no intrão ou num dos exões adjacentes. Assim, dependendo da série de elementos de "splicing" aberrantes criados pela mutação particular, o oligonucleótido complementar da sequência codificadora pode ser sintetizado para bloquear uma variedade de diferentes elementos de "splicing" para realizar o presente invento: pode bloquear um elemento mutado, um elemento críptico ou

um elemento nativo; pode bloquear um local de "splicing" 5', um local de "splicing" 3' ou um ponto de ramificação. Em geral, não bloqueará um elemento de "splicing" que também define o intrão nativo, certamente tendo em consideração a situação em que o bloqueio de um elemento de "splicing" nativo activa um elemento críptico que depois serve como membro substituto da série nativa de elementos de "splicing" e participa no "splicing" correcto, como discutido atrás.

O comprimento do oligonucleótido complementar da sequência codificadora (*i.e.*, o número de nucleótidos) não é crítico desde que se ligue selectivamente ao local pretendido e possa ser determinado de acordo com procedimentos de rotina. Em geral, o oligonucleótido complementar da sequência codificadora terá entre 8, 10 e 12 nucleótidos de comprimento até 20, 30 ou 50 nucleótidos de comprimento.

Os oligonucleótidos complementares da sequência codificadora que não activam a RNase H podem ser preparados de acordo com técnicas conhecidas. Ver, *e.g.*, Patente U.S. N° 5149797 de Pederson *et al.* (AS descrições de todas as referências de patente ali citadas são aqui incluídas como referência). Tais oligonucleótidos complementares da sequência codificadora, que podem ser sequências desoxirribonucleotídicas ou ribonucleotídicas, simplesmente possuem qualquer modificação estrutural que espacialmente iniba ou evite a ligação de RNaseH a uma molécula de dupla hélice

contendo o oligonucleótido como um seu membro, modificação estrutural essa que não inibe substancialmente ou destrói a formação da dupla hélice. Devido aos fragmentos do oligonucleótido envolvido na formação da dupla hélice serem substancialmente diferentes dos fragmentos envolvidos na ligação de RNase H, ficam disponíveis numerosos oligonucleótidos complementares da sequência codificadora que não activam a RNase H. Por exemplo, tais oligonucleótidos complementares da sequência codificadora podem ser oligonucleótidos em que pelo menos um, ou a totalidade, dos resíduos de fosfato que ligam os nucleótidos uns aos outros são fosfatos modificados, como sejam metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosforomorfolidatos, fosfopiperazidatos e fosforamidatos. Por exemplo, um resíduo fosfato sim um resíduo fosfato não que ligam os nucleótidos podem ser modificados como descrito. Num outro exemplo não limitante, tais oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras são oligonucleótidos em que pelo menos um, ou a totalidade, dos nucleótidos possui um grupo alquilo inferior 2' (e.g., alquilo C1-C4, linear ou ramificado, saturado ou insaturado, como seja metilo, etilo, etenilo, propilo, 1propenilo, 2-propenilo e isopropilo). Por exemplo, um nucleótido sim um não pode ser modificado como descrito. Ver também P. Furdon *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 17, 9193-9204 (1989); S. Agrawal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1401-1405 (1990); C. Baker *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18, 3537-3543 (1990); B. Sproat *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 17, 3373-3386 (1989); R. Walder and J. Walder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5011-5015 (1988).

Os medicamentos, oligonucleótidos e formulações do presente invento possuem uma variedade de utilizações. São úteis no processo de fermentação em que se pretende ter um meio de regulação negativa de um gene a ser expresso até determinada altura, após o que se pretende regular a expressão genica positivamente (e.g., regular negativamente durante a fase de crescimento da fermentação e regular positivamente durante a fase de produção da fermentação). Para tal utilização, o gene a ser expresso pode ser qualquer gene codificador de uma proteína a ser produzida por fermentação, desde que o gene possua um intrão nativo. O gene pode então ser alterado por qualquer meio adequado, como seja mutagénese específica de local (ver T. Kunkel, Patente U.S. N° 4873192), para deliberadamente criar uma segunda série aberrante de elementos de "splicing" que definem um intrão aberrante, o qual substancialmente regula negativamente a expressão do gene. O gene pode ser então inserido num vector de expressão adequado e o vector de expressão inserido numa célula hospedeira (e.g., uma célula eucariótica como seja uma levedura, célula de insecto ou célula de mamífero (e.g., humana, de ratinho)) através de técnicas recombinantes convencionais. Quando se pretende regular positivamente a expressão do gene alterado, um oligonucleótido complementar da sequência codificadora, numa formulação adequada, que se liga a um membro da segunda série aberrante de elementos de "splicing", é então adicionado ao meio de cultura para que a expressão do gene seja regulada positivamente.

Os medicamentos, oligonucleótidos e formulações do presente invento são também úteis como ferramentas *in vitro* ou *in vivo* para avaliar o "splicing" em genes humanos ou animais que sejam regulados pelo desenvolvimento e/ou nos tecidos. Tais experiências podem ser realizadas pelos procedimentos descritos abaixo, ou modificação dos mesmos, que serão aparentes para os familiarizados com a matéria.

Os medicamentos, oligonucleótidos e formulações do presente invento são igualmente úteis como agentes terapêuticos no tratamento de doenças envolvendo "splicing" aberrante, como seja  $\beta$ -talassémia (em que o oligonucleótido se ligaria a pré-mRNA de  $\beta$ -globina, particularmente humana),  $\alpha$ -talassémia (em que o oligonucleótido se ligaria a pré-mRNA de  $\alpha$ -globina), síndrome de Tay-Sachs (em que o oligonucleótido se ligaria a pré-mRNA da subunidade  $\alpha$  de  $\beta$ -hexoseaminidase), fenilcetonúria (em que o oligonucleótido se ligará ao pré-mRNA da hidroxilase de fenilalanina) e determinadas formas de fibrose cística (em que o oligonucleótido se ligaria ao pré-mRNA do gene da fibrose cística), em que mutações conducentes a "splicing" anormal de pré-mRNA foram identificadas (Ver, e.g., S. Akli et al., J. Biol. Chem. 265, 7324 (1990); B. Dworniczak et al., Genomics 11, 242 (1991); L-C. Tsui, Trends in Genet. 8, 392 (1992)).

Exemplos de  $\beta$ -talassémia que podem ser tratados pelo presente invento incluem, mas não estão limitados aos



da classe de mutantes  $\beta^{110}$ , -IVS1<sup>5</sup>, -IVS1<sup>6</sup>, ISV2<sup>654</sup>, ISV2<sup>705</sup> e ISV2<sup>745</sup> (i.e., em que o pré-mRNA da  $\beta$ -globina é portador das referidas mutações).

O termo "oligonucleótido complementar de sequências codificadoras" inclui sais fisiologicamente e farmacologicamente aceitáveis; i.e. sais que mantêm a actividade biológica pretendida do composto parental e não conferem efeitos tóxicos indesejáveis. Exemplos de tais sais são os sais formados com catiões tais como sódio, potássio,  $\text{NH}_4^+$ , magnésio, cálcio, poliaminas tais como espermina e espermidina, etc.; (b) sais de adição de ácidos formados com ácidos inorgânicos, por exemplo ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico e similares; (c) sais formados com ácidos orgânicos tais como, por exemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzóico, ácido tânico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutâmico, ácido naftalenossulfónico, ácido metanossulfónico, ácido p-toluenossulfónico, ácido naftalenodissulfónico, ácido poligalacturónico e similares; e (d) sais formados a partir de aniões elementares tais como os de cloro, bromo e iodo.

As formulações do presente invento compreendem o oligonucleótido complementar da sequência codificadora num veículo fisiologicamente ou farmacologicamente aceitável,

como seja um veículo aquoso. Assim, as formulações para usar no presente invento incluem, mas não estão limitadas às adequadas para administração parentérica, incluindo administração subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravenosa e inta-arterial, assim como administração tópica (*i.e.*, administração de uma formulação em aerossol, de partículas respiráveis, aos pulmões de um doente que sofra de fibrose cística). As formulações podem ser convenientemente apresentadas na forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer um dos métodos conhecidos na área. Em qualquer caso, a via mais adequada de administração depende do indivíduo, natureza e gravidade da condição a ser tratada e do composto particular a ser usado.

O presente invento proporciona para uso oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras, tendo as características descritas atrás, para a preparação de um medicamento destinado a regular positivamente a expressão génica num doente atingido por uma perturbação de "splicing" aberrante, como descrito atrás. Na produção de um medicamento de acordo com o invento, o oligonucleótido complementar da sequência codificadora é tipicamente misturado com, *inter alia*, um veículo aceitável. O veículo deve, certamente, ser aceitável no sentido de ser compatível com quaisquer outros ingredientes na formulação e não deve ser prejudicial para o doente. O veículo pode ser sólido ou líquido. Um ou mais oligonucleótidos complemen-

tares de sequências codificadoras podem ser incorporados nas formulações do invento, as quais podem ser preparadas por qualquer uma das técnicas de farmácia conhecidas, consistindo essencialmente na mistura dos componentes, facultativamente incluindo um ou mais ingredientes terapêuticos acessórios.

As formulações do presente invento podem compreender soluções estéreis para injeção, aquosas e não aquosas, do composto activo, preparações que são preferencialmente isotónicas com o sangue do recipiente a que se destinam e essencialmente apirogénicas. Estas preparações podem conter anti-oxidantes, tampões, bacteriostáticos e solutos que tornam a formulação isotónica relativamente ao sangue do recipiente a que se destina. As suspensões estéreis, aquosas e não aquosas, podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. As formulações podem ser apresentadas em embalagens de doses unitárias ou de múltiplas doses, por exemplo ampolas e frascos fechados, e podem ser guardadas na forma liofilizada, requerendo apenas a adição de veículo líquido estéril, por exemplo, soro fisiológico ou água para injeção, imediatamente antes de usar.

Na formulação o oligonucleótido complementar da sequência codificadora pode estar dentro de uma partícula ou vesícula lipídica, como seja um lipossoma ou microcristal, que pode ser adequado para administração parentérica. As partículas podem ser de qualquer estrutura

adequada, como sejam unilamelares ou plurilamelares, desde que contenham o oligonucleótido complementar da sequência codificadora. Lípidos carregados positivamente, tais como metilssulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, ou "DOTAP", são particularmente preferidos para tais partículas e vesículas. A preparação de tais partículas lipídicas é conhecida. Ver, e.g., Patentes U.S. Nos 4880635 a Janoff et al.; 4906477 de Kurono et al.; 4911928 de Wallach; 4917951 de Wallach; 4920016 de Allen et al.; 4921757 de Wheatley et al.; etc.

A dosagem do oligonucleótido complementar de sequências codificadoras administrada dependerá do método particular a ser realizado e de quando está a ser administrado ao indivíduo, dependerá da doença, da condição do indivíduo, da formulação particular, da via de administração, etc. Em geral, são pretendidas concentrações intracelulares do oligonucleótido entre 0,05 e 50  $\mu\text{M}$ , ou mais particularmente de 0,2 a 5  $\mu\text{M}$ . Para administração a um indivíduo, como seja um ser humano, é empregue uma dosagem entre cerca de 0,01, 1 ou 1 mg/Kg e 50, 100 ou 150 mg/Kg.

O presente invento é explicado mais detalhadamente nos exemplos não limitantes que se seguem. As sequências nucleotídicas são aqui representadas por uma cadeia simples apenas, na direcção 5' para 3', da esquerda para a direita.

## EXEMPLO 1

Estrutura e construção de pré-mRNAs

A construção e a estrutura de várias moléculas de pré-mRNA de  $\beta$ -globina humana estão ilustradas na Figura 1. Os rectângulos indicam exões; as linhas a cheio, intrões. As posições das mutações (110 e 705) relativamente ao nucleótido 1 de IVS1 e IVS2, respectivamente, estão apresentadas acima do clone HBA6. Os números abaixo indicam o comprimento, em nucleótidos, de exões e intrões. Os oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras (discutidos detalhadamente abaixo) estão indicados pelas barras curtas numeradas por baixo das construções  $\beta^{110}$  e ISV<sup>705</sup>, e as vias de "splicing" pelas linhas a tracejado. Todos os pré-mRNAs foram transcritos pela polimerase de RNA de SP6 (M. Konarska et al., Cell 38, 731 (1984)) a partir de fragmentos adequados do gene da  $\beta$ -globina humana subclonado no vector SP64. HBA6 (A. Krainer et al., Cell 36, 993 (1984)) possui a totalidade do gene da  $\beta$ -globina humana. A construção  $\beta^{110}$  possui os exões 1 e 2 e foi subclonada a partir do clone talassémico original (R. Spritz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2455 (1981)). Antes da transcrição, os plasmídeos foram linearizados no local BamHI. Para construir o plasmídeo IVS2<sup>705</sup>, um fragmento de HBA6, contendo virtualmente a totalidade do segundo exão, a totalidade do segundo intrão e um fragmento grande do terceiro exão, foi primeiro subclonado em SP64 e subsequentemente sujeito a mutagénese específica de sítio

de acordo com técnicas conhecidas. (T. Kunkel et al., Methods Enzymol. 154, 367 (1987)) para introduzir uma mutação de T para G no nucleótido 705 do intrão. A transcrição foi então realizada num plasmídeo linearizado no local PvuII.

## EXEMPLO 2

### Síntese de 2'-O-metil-oligo-ribonucleótidos complementares de sequências codificadoras

Os 2'-O-metil-oligo-ribonucleótidos, para usar nos exemplos aqui descritos, foram sintetizados de acordo com técnicas conhecidas usando reagentes da Glen Research (Sterling, VA) e purificados de acordo com técnicas conhecidas usando o estojo ("kit") de purificação SUREPURE™ disponível na US Biochemicals.

Os 2'-O-metil-oligo-ribonucleótidos produzidos foram designados como oligo 1 a oligo 5.

O oligo 1 (GUCAGUGCCUAUCA) (SEQ ID NO:1), complementar dos nucleótidos 82-95 do intrão 1, foi dirigido contra o ponto de ramificação normal e o oligo 2 (AUAGACUAAUAGGC) (SEQ ID NO:2), complementar dos nucleótidos 103-116 do intrão 1, contra o local de "splicing" 3' aberrante criado pela mutação  $\beta^{110}$  no intrão 1 do gene da  $\beta$ -globina. O oligo 3 (CAUUAUUGCCCUGAAAG) (SEQ ID NO:3), complementar dos nucleótidos 573-589 do intrão 2, é dirigido

contra o local de "splicing" 3' críptico no nucleótido 579 do segundo intrão e o oligo 4 (CCUCUUACCUCAGUUAC) (SEQ ID NO:4), complementar dos nucleótidos 697-713, é dirigido contra o local de "splicing" 5' aberrante criado pela mutação no nucleótido 705 no segundo intrão do pré-mRNA de IVS2<sup>705</sup>. O oligo 5 (GCUAUUACCUUAACCCAG) (SEQ ID NO:5) é dirigido contra o local de "splicing" 5' aberrante pela mutação IVS<sup>654</sup> (nucleótidos 643-660 do intrão 2). O oligo 6 (GCCUGACCACCAAC) (SEQ ID NO:6) é dirigido contra o local de "splicing" 5' críptico no exão 1 de pré-mRNA de globina (nucleótidos -23 a -10 relativamente ao nucleótido 1 do intrão 1).

### EXEMPLO 3

Reversão de "splicing" aberrante por um oligonucleótido complementar da sequência codificadora dirigido contra o ponto de ramificação normal do intrão 1 de  $\beta$ -globina humana

Na talassémia  $\beta^{110}$ , uma forma da doença predominante em doentes de origem grega e cipriota, uma mutação de A para G no nucleótido 110 do primeiro intrão do gene de  $\beta$ -globina humana cria um local de "splicing" 3' adicional aberrante (R. Spritz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2455 (1981)). Apesar da presença do local de "splicing" 3' normal, o local aberrante é preferencialmente usado pela maquinaria de "splicing", resultando num mRNA incorrectamente processado que possui 19 nucleótidos da sequência do intrão (Fig. 1). Nas células transfectadas com o alelo da

$\beta^{110}$ -globina (M. Busslinger *et al.*, Cell 27, 289 (1981); Y. Fukumaki *et al.*, Cell 28, 585 (1982)) ou durante "splicing" do seu transcrito em extractos nucleares (R. Reed e T. Maniatis, Cell 41, 95 (1985)) (ver também Fig. 2, pista 2) o mRNA correctamente processado constitui apenas cerca de 10% do produto processado, consistente com os níveis marcadamente reduzidos de hemoglobina normal observados em doentes com esta forma de talassémia. Encontrou-se que no pré-mRNA  $\beta^{110}$  o local de "splicing" 3' aberrante recruta o ponto de ramificação normal no nucleótido 93 do intrão, competindo com o local de "splicing" 3' correcto e assim previne o "splicing" correcto (R. Reed e T. Maniatis, Cell 41, 95 (1985)). É significativo para este trabalho que as mutações inactivadoras do ponto de ramificação normal activam um ponto de ramificação críptico no nucleótido 107 e resultam em "splicing" no local de "splicing" 3' correcto (Y. Zhuang and A. Weiner, Genes and Dev. 3, 1545 (1989)). O "splicing" aberrante não pode ter lugar devido à proximidade do ponto de ramificação críptico relativamente ao local de "splicing" 3' alterado na posição 110.

Para testar se os oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras, dirigidos contra a sequência do ponto de ramificação normal, forçarão a maquinaria de "splicing" a seleccionar o ponto de ramificação críptico e darão origem a um mRNA correctamente processado, um 2'-O-metil-oligonucleótido de 14 nucleótidos de comprimento (oligonucleótido 1, (SEQ ID NO:1)) foi dirigido contra a sequência do ponto de ramificação no intrão 1 do pré-mRNA



de  $\beta$ -globina. Os oligonucleótidos 2'-O-metilados foram seleccionados para esta e outras experiências subsequentes, uma vez que são resistentes às nucleases e formam híbridos estáveis com RNA que não são degradados pela RNaseH (H. Inoue *et al.*, Nucleic Acids Res. (1987); B. Sproat *et al.*, Nucleic Acids Res. 17, 3373 (1989)). A degradação pela RNase H, ver por exemplo quando os oligodesoxinucleótidos complementares da sequência codificadora ou os seus derivados fosforotioato são usados, destruirá o pré-mRNA substrato e inibirá qualquer "splicing".

A Figura 2 mostra a reversão do "splicing" aberrante pelo oligonucleótido 1 dirigido contra o ponto de ramificação normal no intrão 1 do pré-mRNA de  $\beta$ -globina. O "splicing" de pré-mRNA  $\beta^{110}$  marcado com  $P^{32}$  (aproximadamente  $10^5$  cpm por reacção, 25 fmoles) foi realizado *in vitro* num extracto nuclear de células HeLa durante 2 horas, essencialmente como descrito (A. Krainer *et al.*, Cell 36, 993 (1984); Z. Domonski e R. Kole, Mol. Cell. Biol. 12, 2108 (1992)), excepto o volume da reacção ser duplicado para 50  $\mu$ l. Os produtos de reacção foram analisados num gel de sequenciação de 8% de poliacrilamida e visualizados por auto-radiografia. A estrutura dos produtos e intermediários está descrita à direita, o seu tamanho em nucleótidos está apresentado à esquerda. Um asterisco significa mobilidade aberrante dos intermediários contendo estruturas em laço. Pista 1, "splicing" de pré-mRNA H $\beta$ 6 controlo. Pista 2, "splicing" de pré-mRNA  $\beta^{110}$ . Pistas 3-8, "splicing" de pré-mRNA  $\beta^{110}$  na presença de quantidades crescentes (indicado no

topo da figura) do oligonucleótido 1. Pista 9, "splicing" de pré-mRNA  $\beta^{110}$  na presença do oligonucleótido 3, dirigido contra uma sequência no intrão 2 do pré-mRNA de  $\beta$ -globina.

A análise destes dados mostra que na reacção de controlo sem o oligonucleótido (Fig. 2, pista 2), a proporção dos produtos incorrectamente processados, relativamente aos correctamente processados, é de aproximadamente 9:1. A adição do oligonucleótido 1 em concentrações de 0,01 a 1,0  $\mu\text{g}$  por reacção (0,05-5  $\mu\text{M}$ ) causa inibição de "splicing" aberrante e indução do "splicing" correcto do substrato dependentes da dose (Fig. 2, pistas 3-6). A 1,0  $\mu\text{g}$  do oligonucleótido a proporção de produtos processados é invertida para 1:5. O efeito do oligonucleótido é específico de sequência, uma vez que a adição de 1  $\mu\text{g}$  de um oligonucleótido dirigido contra o local de "splicing" críptico 3' no segundo intrão do gene da  $\beta$ -globina (oligonucleótido 3, (SEQ ID NO:3); ver também abaixo) não afecta a proporção original dos produtos processados (Fig. 2, pista 9). A 2,0 e 4,0  $\mu\text{g}$  do oligonucleótido 1, o "splicing" em ambos os locais é inibido e um fragmento de RNA de 243-meros é gerado (Fig. 2, pistas 7-8). Este fragmento acumula-se apenas em condições de "splicing", i.e. na presença de ATP e de outros componentes da mistura de "splicing" e, muito provavelmente, representa um produto da clivagem no local da ligação do oligonucleótido por uma nuclease dependente de ATP.

O local de "splicing" 3' aberrante gerado pela

mutação  $\beta^{110}$ , também parece ser um alvo para reversão do "splicing" aberrante por um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras. O bloqueio desta sequência deverá ser a forma mais simples de forçar a maquinaria de "splicing" a usar o local de "splicing" 3' original no final do intrão. No entanto, um 14-mero (oligo 2, (SEQ ID NO:2)) dirigido contra o local de "splicing" aberrante não foi eficaz; em concentrações crescentes do oligonucleótido a acumulação de ambos os produtos processados foi inibida, o correctamente processado sendo inibido mais eficientemente (Fig. 3, pistas 2-5). O "splicing" foi realizado nas mesmas condições descritas relativamente à Fig. 2. É interessante que o primeiro passo da reacção de "splicing", clivagem do local de "splicing" 5' e formação do intermediário estrutura em laço-exão, parece ser menos afectado pelo oligo 2 do que a formação do produto final processado. Isto é mostrado pela presença destes intermediários mesmo quando 1 ou 2  $\mu\text{g}$  do oligonucleótido foram adicionados à reacção de "splicing" (Fig. 3, pistas 5-6). A 4  $\mu\text{g}$  por reacção a clivagem no local de "splicing" 5' é inibida (Fig. 3, pista 7).

Os diferentes efeitos do oligo 1 e do oligo 2 reflectem interacções complexas entre os oligonucleótidos, os numerosos factores de "splicing" e elementos da sequência situados no segmento de 37 nucleótidos entre o ponto de ramificação normal e o local de "splicing" 3' correcto. Claramente, o oligonucleótido 1, hibridado com o ponto de ramificação normal no extremo 5' desta região, evita a

ligação dos factores de "splicing" a esta sequência forçando-os a seleccionar o ponto de ramificação críptico a jusante. Isto conduz à inibição de "splicing" aberrante e indução de "splicing" correcto do pré-mRNA  $\beta^{110}$ . Pelo contrário, a hibridação do oligo 2 com a sua sequência alvo localizada centralmente poderá impedir a ligação de um grande número de factores de "splicing" que são montados nesta região e evita qualquer "splicing". Note-se também que este oligonucleótido bloqueia uma porção significativa do segmento de polipirimidina que é essencial para "splicing" dos locais de "splicing" 3' aberrante e correcto. Isto é uma explicação alternativa para o facto de este oligonucleótido ter falhado o restabelecimento da via de "splicing" correcta.

#### EXEMPLO 4

Reversão de "splicing" aberrante por oligonucleótidos complementares da sequência codificadora contra os locais de "splicing" 5' e 3' do intrão 2 de  $\beta$ -globina humana

A questão de um local de "splicing" 3' aberrante poder, no entanto, ser usado para reversão de "splicing" incorrecto foi ainda testado em pré-mRNA portador de uma mutação T para G na posição 705 do segundo intrão do gene da  $\beta$ -globina humana. Esta mutação (IVS2<sup>705</sup>), encontrada em doentes com talassémia do Mediterrâneo, cria mais um local de "splicing" 5' aberrante, 145 nucleótidos a montante do local de "splicing" 3' normal (C. Dobkin and A. Bank, J.

Biol. Chem. 260, 16332 (1985)). Durante o "splicing", um local de "splicing" 3' críptico é activado na posição 579 do intrão resultando na remoção de nucleótidos 1-758 e 706-850 como intrões separados e incorporação da restante porção do intrão no produto de "splicing" (Fig. 1). Neste RNA as distâncias entre cada um dos elementos da sequência envolvidos no "splicing" excede 100 nucleótidos e não deverão ser esperados efeitos de impedimento espacial pelos oligonucleótidos.

A reversão do "splicing" aberrante do pré-mRNA IVS2<sup>705</sup> pelo oligonucleótido 3 (SEQ ID NO:3) dirigido contra o local de "splicing" 3' críptico e o oligonucleótido 4 (SEQ ID NO:4) dirigido contra o local de "splicing" 5' aberrante no intrão 2 do IVS2<sup>705</sup> está mostrada na Figura 4. As condições da reacção de "splicing" foram as mesmas descritas relativamente à Fig. 2 atrás, excepto antes de ser usado o transcrito de RNA ser purificado por electroforese num gel de sequenciação de 6%. Pista 1, DNA usado. Pistas 2 e 3, "splicing" dos transcritos controlo (indicado no topo da figura). Pistas 4-8 e 9-13, "splicing" do pré-mRNA IVS2<sup>705</sup> na presença do oligonucleótido 3 e do oligonucleótido 4, respectivamente. As quantidades dos oligonucleótidos na reacção estão indicadas no topo. "?" à esquerda indica produto de degradação aparente.

O transcrito controlo contendo o segundo intrão do pré-mRNA da  $\beta$ -globina normal é processado eficazmente (Fig. 4, pista 2) gerando os intermediários esperados (o

exão 5' e as estruturas em laço maiores) e o produto correctamente processado, 451 nucleótidos de comprimento. O "splicing" do pré-mRNA IVS2<sup>705</sup> é também eficiente e dá um produto processado adicional de 577 nucleótidos de comprimento e o intermediário 348-meros esperado, resultante da via de "splicing" aberrante causada pela mutação (Fig. 4, pista 3). A proporção 1:2 de RNAs correctamente processados relativamente a incorrectamente processados é semelhante ao observado anteriormente *in vivo*. O oligonucleótido 3 (Fig. 1) dirigido para o local de "splicing" 3' críptico activado no nucleótido 579 é muito activo, induzindo reversão dependente de dose do "splicing" para a via de "splicing" correcta (Fig. 4, pistas 4-8). A 0,1 e 0,4 µg do oligonucleótido por reacção, a reversão é virtualmente completa. O "splicing" correcto é igualmente obtido em concentrações semelhantes de oligonucleótido 4 (Fig. 1) dirigido contra o local de "splicing" 5' aberrante criado pela mutação no nucleótido 705 do segundo intrão (Fig. 4, pistas 9-13). A 1 e 2 µg por reacção, qualquer um dos oligonucleótidos não teve efeitos adicionais; a 4 µg por reacção (20 µM) o "splicing" foi inibido na sua totalidade (não apresentado). Outras bandas, incluindo uma banda forte marcada com "?" numa figura são provavelmente devidas a degradação por nucleases do pré-mRNA longo (1301 nucleótidos).

Estes resultados mostram que o local de "splicing" 3' críptico, assim como o local de "splicing" 5' alterado, constituem alvos adequados para reversão

específica de "splicing" aberrante. Efeitos semelhantes dos oligonucleótidos 3 e 4, sugerem que não existem grandes diferenças nas suas acessibilidades aos locais alvo de "splicing". Ambos os oligonucleótidos são aproximadamente 10 vezes mais eficazes do que o oligonucleótido 1 usado nas experiências mostradas na Fig. 2. Esta maior eficiência pode ser devida a vários factores. Os oligonucleótidos 3 e 4 têm mais três nucleótidos do que o oligonucleótido 1 e podem formar híbridos mais estáveis com o RNA. Eles bloqueiam locais de "splicing" aberrantes, permitindo que a maquinaria de "splicing" use os locais de "splicing" correctos e, presumivelmente, o ponto de ramificação correcto. Pelo contrário, no pré-mRNA  $\beta^{110}$  o oligonucleótido 1 força a maquinaria de "splicing" a usar uma sequência subóptima de ponto de ramificação críptico, o que pode resultar na geração relativamente ineficiente de mRNA correctamente processado. Nas experiências apresentadas na Fig. 4, o pré-mRNA longo adicionado é fracamente detectável após 2 horas da reacção, sugerindo a sua instabilidade. Assim, apesar das concentrações molares dos oligonucleótidos serem essencialmente as mesmas das experiências anteriores, eles podem ter estado num excesso muito superior ao pré-mRN substrato.

Nas experiências apresentadas atrás os oligonucleótidos foram adicionados simultaneamente com os outros componentes da reacção de "splicing". A pré-hibridação dos oligonucleótidos com o pré-mRNA não aumentou a sua eficiência e os oligonucleótidos adicionados 15 minutos

após o início da reacção, *i.e.* após os complexos de "splicing" terem tido uma oportunidade de se formarem (B. Ruskin and M. Green, Cell 43, 131 (1985)), foram quase tão eficazes (dados não apresentados). Estes resultados indicam que os oligonucleótidos contendo a modificação 2'-O-metilo são capazes de competir eficazmente pelas suas sequências alvo com os factores de "splicing". A elevada actividade destes compostos é mito provavelmente devida à sua forte hibridação com RNA.

#### EXEMPLO 5

Reversão de "splicing" aberrante com um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras que bloqueia o local de "splicing" 3' críptico ISV1-5 e IVS1-6

Esta experiência foi realizada essencialmente como descrito abaixo, excepto as mutações talassémicas serem as mutações IVS1-5 e IVS1-6, em que o local de "splicing" 5' autêntico de IVS1 está alterado. O "splicing" aberrante que resulta em talassémia é aparentemente devido ao facto de as mutações IVS1-5 e IVS1-6 enfraquecerem o local de "splicing" 5' e permitirem que o local de "splicing" críptico, situado 16 nucleótidos a montante, compita com êxito para os factores de "splicing". Nesta experiência testámos se um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras para o local de "splicing" críptico pode reverter o "splicing" aberrante do local de "splicing" 5' mutado e restaurar o "splicing" correcto



apesar das mutações, uma vez que locais de "splicing" semelhantes aos mutados parecem ser funcionais noutros pré-mRNAs. O oligonucleótido empregue é o oligo 6 (SEQ ID NO:6), um 2-O-metilribo-oligonucleótido produzido como descrito no Exemplo 2 atrás.

#### EXEMPLO 6

Reversão de "splicing" aberrante com um oligonucleótido complementar da sequência codificadora que bloqueia o local de "splicing" 5' aberrante da mutação IVS2<sup>654</sup>

Estas experiências foram realizadas essencialmente como descrito atrás, excepto ser empregue o pré-mRNA da  $\beta$ -globina humana contendo a mutação IVS2<sup>654</sup>, e ser empregue o oligo 5 (SEQ ID NO:5).

A mutação IVS2<sup>654</sup>, frequentemente identificada nos indivíduos talassémicos de origem chinesa, afecta o "splicing" através da criação de um local de "splicing" 5' adicional no nucleótido 653 e activando o local de "splicing" 3' críptico comum no nucleótido 579 do intrão 2. A eficiência de "splicing" aberrante do pré-mRNA IVS2<sup>654</sup> é superior à do pré-mRNA IVS2<sup>705</sup> e apenas pequenas quantidades de produto correctamente processado, relativamente ao aberrante, são detectáveis durante "splicing" *in vitro*. Apesar da elevada eficiência do "splicing" aberrante, o oligo 3, dirigido contra o local de "splicing" 3' críptico, assim como o oligo 5, dirigido contra o local de "splicing"

5' aberrante, restauraram eficazmente o "splicing" correcto em concentrações semelhantes às descritas atrás. Numa concentração de 2  $\mu$ M de qualquer um dos nucleótidos, o produto correctamente processado acumula-se e o produto aberrante é virtualmente indetectável (dados não apresentados).

#### EXEMPLO 7

Reversão de "splicing" aberrante através de oligonucleótido complementar de sequências codificadoras que bloqueia o ponto de ramificação do intrão 1 da  $\beta$ -globina humana

Esta experiência foi realizada essencialmente como descrito atrás para restaurar o "splicing" correcto em pré-mRNA mutante  $\beta$ -110, excepto o oligonucleótido se ligar a uma sequência localizada imediatamente a montante da sequência nativa do ponto de ramificação do intrão 1 do gene da  $\beta$ -globina (nucleótidos 75-88). A sequência do oligonucleótido é CCCAAAGACUAUCC (SEQ ID NO:7). O "splicing" correcto foi restaurado.

#### EXEMPLO 8

Construção de linhas celulares expressando o pré-mRNA de  $\beta$ -globina humana talassémica

Foi construída uma série de linhas celulares estáveis, por transfecção de células HeLa e células CHO com

genes de globina talassémica sob o controlo do promotor precoce imediato de citomegalovírus. Os genes incluem as mutações IVS1-110, IVS2-654 e IVS1-5.

Linhas celulares estáveis foram obtidas de acordo com técnicas convencionais. Ver, *e.g.*, Current Protocols in Molecular Biology (P. Ausubel *et al.*, eds. 1987). Resumidamente, as células foram cotransfectadas com plasmídeos portadores de genes de globina talassémica sob o controlo do promotor de CMV e portadores do gene de resistência à neomicina como marca seleccionável (pSV2neo). A transfecção foi por electroporação, (Z. Dominski e R. Kole, Mol. Cel. Biol. 11: 6075-6083 (1991); Z. Dominski and R. Kole, Mol. Cell. Biol. 12:2108-2114 (1992)) ou pelo método do fosfato de cálcio. As células foram semeadas e após 24-48 horas incubadas com meio selectivo contendo G418. As colónias que sobreviveram foram expandidas e testadas relativamente à expressão do mRNA de globina talassémica.

Isolou-se RNA total a partir de aproximadamente  $10^5$  células usando Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) seguindo o protocolo do fabricante. Este método permite o processamento fácil de um grande número de pequenas amostras e dá rendimentos elevados de RNA de boa qualidade. Os padrões de "splicing" foram analisados por RT-PCR, usando polimerase rTth e seguindo o protocolo do fabricante (Perkin Elmer). Não foi necessário mais de 1-5% do RNA isolado para a detecção de RNA processado em células transfectadas transitoriamente, assim o método é

suficientemente sensível para a detecção fácil em linhas celulares estáveis. O passo da transcriptase reversa foi realizado com uma sequência iniciadora 3' que hibrida com as sequências aberrantes no mRNA talassémico e abrange a junção de "splicing". Isto assegura que o DNA contaminante e o RNA normal da globina não sejam detectados e não interfiram com o ensaio. As linhas celulares clonadas que expressam pré-mRNA talassémico foram usadas para o tratamento com 2'-O-metil-oligonucleótido complementar de sequências codificadoras como descrito abaixo.

#### EXEMPLO 9

##### Administração de oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras na cultura celular

As células produzidas no Exemplo 8 atrás foram crescidas em placas de cultura de 24 alvéolos contendo 200  $\mu$ l de meio por alvéolo.  $2 \times 10^4$  células foram semeadas por alvéolo e quando aderentes foram tratadas com 200  $\mu$ l de meio contendo até uma concentração de 50  $\mu$ M dos oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras. As células foram cultivadas até 4 dias na presença do oligonucleótido antes de atingirem a confluência ( $2-3 \times 10^5$  células). Uma vez que os oligonucleótidos 2'-O-metilados são muito estáveis no meio contendo soro, o meio só foi mudado com intervalos de dois dias. A concentração de 50  $\mu$ M (40  $\mu$ g por alvéolo) do oligonucleótido representa um excesso de 100 vezes relativamente ao necessário para induzir uma restauração eficiente do "splicing" *in vitro*.

Mesmo nesta concentração, a síntese de um único oligonucleótido na escala de 1  $\mu$ mole, dando 1-1,6 mg do oligonucleótido, proporciona material suficiente para 25 a 40 amostras.

Numa abordagem alternativa, as células foram pré-tratadas com o reagente Lipofectin™ (DOTMA, da BRL) numa concentração de 10  $\mu$ g/ml antes da adição de oligonucleótidos, de acordo com técnicas conhecidas. (C. Benett et al., Mol. Pharm. 41:1023-1033 (1992)).

Após tratamento, o RNA total foi isolado como atrás e testado, por RT-PCR, relativamente à presença de mRNA correctamente processado. A amplificação de sequências iniciadoras foi realizada na presença de ATP marcado com alfa-P32 para aumentar a sensibilidade de detecção e reduzir o número de ciclos para 15.

Os exemplos anteriores são ilustrativos do presente invento e não devem ser pensados como limitantes do mesmo. O invento é definido pelas reivindicações que se seguem, com os equivalentes das reivindicações incluídos no mesmo.

#### EXEMPLO 10

##### Transfecção com lipossomas

Uma linha de células, baseada em HeLa estavelmente transfectadas com o clone da  $\beta$ -globina humana porta-

dor da mutação talassêmica IVS2-654, foi usada para realizar as seguintes experiências. Um subclone da linha celular ISV2-654 expressa, predominantemente, pré-mRNA de  $\beta$ -globina aberrantemente processado e pequenas quantidades das espécies correctamente processadas. Um segundo subclone, designado ISV2-654\*, expressa pré-mRNAs de  $\beta$ -globina aberrantemente e correctamente processados numa proporção de aproximadamente 1:1. Aproximadamente  $10^5$  das células ISV2-654 crescidas em monocamada foram tratadas com 3  $\mu$ M do 2'-O-metil-ribo-oligonucleótido (17-mero) complementar de sequências codificadoras para o local de "splicing" 3' críptico [oligo 3; CAUUAUUGCCCUGAAAG; (SEQ ID NO:3)] na presença de 20  $\mu$ g/ml do reagente de transfecção com lipossomas LIPOFECTIN™ (BRL) de acordo com as especificações do fabricante, durante 5 horas, em meio OPTI-MEM sem soro. Após incubação, o meio foi removido e as células voltaram para o meio de crescimento normal (MEM + 10% de soro fetal de vitela). As células não tratadas e as células tratadas apenas com lipofecção foram usadas como controlo. Após crescimento durante a noite, RNA de células totais foi isolado usando Tri-reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) seguindo o protocolo do fabricante. O RNA foi quantificado por absorvância a 260 nm.

A análise de "splicing" foi realizada por transcriptase reversa-PCR (RT-PCR). Uma quantidade igual de RNA para cada amostra foi testada usando um estojo ("kit") rTth de RT-PCR (Cetus-Perkin Elmer). O protocolo do fabricante foi seguido com excepção de 1  $\mu$ Ci de dATP marcado com  $\alpha$ -P32

ter sido adicionado à reacção de RT-PCR. Os produtos de PCR foram analisados num gel não desnaturante de 8% de poliacrilamida. Um oligonucleótido que hibrida com o segundo exão do gene da  $\beta$ -globina humana foi usado como uma sequência iniciadora comum. A sequência específica de "splicing" aberrante (sequência iniciadora A) abrange a junção de "splicing" aberrante, enquanto que a sequência iniciadora do "splicing" correcto (sequência iniciadora C) abrange a junção de "splicing" correcto (Figura 5). Realizou-se RT-PCR com a sequência iniciadora A nas pistas 1, 3 e 5 e com a sequência iniciadora C nas pistas 2, 4 e 6. A quantidade do produto de PCR aplicado nas pistas 1, 3 e 5 foi 1/5 do das pistas 2, 4 e 6. As pistas 1 e 2 mostram "splicing" de pré-mRNA derivado das células tratadas com o reagente LIPOFECTIN™ e 2'-O-metil-oligo-ribonucleótido 3  $\mu$ M; pistas 3 e 4 mostram o "splicing" de pré-mRNA derivado de células tratadas com o reagente LIPOFECTIN™ sozinho; e as pistas 5 e 6 mostram o "splicing" de pré-mRNA derivado de células não tratadas. Note-se o aumento detectável a olho nu do "splicing" correcto para as células tratadas com o oligonucleótido na presença do reagente LIPOFECTIN™ na pista 2.

#### EXEMPLO 11

##### Transferência mediada por adenovírus

Aproximadamente  $10^5$  células ISV2-654\*, crescidas em monocamada durante a noite, foram tratadas com 2'-O-metil-ribo-oligonucleótido (17-mero), 5 e 20  $\mu$ M, comple-

mentar de sequências codificadoras (SEQ ID NO:3) na presença de  $10^6$  partículas de adenovírus deficiente para a replicação (estirpe dl-312, uma oferta do DR. Hu da Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill). O vírus e o oligonucleótido foram pré-incubados durante 30 minutos em OPTI-MEM, depois adicionados à cultura celular e a incubação continuou durante 2 horas. O meio foi aspirado e substituído com um meio de crescimento normal. Após crescimento durante a noite, o RNA total foi isolado como descrito atrás. A reacção de RT-PCR foi realizada como atrás, com excepção de as sequências iniciadoras hibridarem com o segundo e o terceiro exões do gene da  $\beta$ -globina humana, respectivamente. A análise dos produtos foi como descrito no Exemplo 10 atrás, com excepção de quantidades iguais dos produtos de PCR serem aplicadas no gel. Os resultados estão ilustrados na Figura 6. A pista 1 mostrou o "splicing" de células não tratadas; e as pistas 2 e 3 mostraram "splicing" das células tratadas com oligonucleótido 5 e 20  $\mu$ M, respectivamente, na presença de adnovírus. Note-se o aumento detectável a olho nu do "splicing" correcto, juntamente com um decréscimo correspondente no "splicing" aberrante e numa forma dependente de dose, para as células tratadas com oligonucleótido 5 e 20  $\mu$ M.

#### EXEMPLO 12

##### Electroporação

Aproximadamente  $10^5$  células IVS2654\*, crescidas durante a noite em monocamada, foram tripsinizadas e



transferidas em 0,5 ml de OPTI-MEM para uma cuvette de electroporação de 10 mm. 2'-O-metil-ribo-oligonucleótido, 5 ou 50  $\mu$ M, complementar de sequências codificadoras para o local de "splicing" 5' aberrante [oligo 4; (CCUCUUACCUCAGUUAC) (SEQ ID NO:4)] foi adicionado por amostra e a mistura foi electroporada com um pulso de 1500 V usando um electroporador da University of Wisconsin Electronics marcado para 0,75  $\mu$ F. Após electroporação, as células foram ressuspensas no meio de crescimento normal e crescidas em monocamada durante a noite. O RNA total foi isolado como descrito abaixo e analisado por RT-PCR como descrito no Exemplo 11 atrás.

Os resultados estão ilustrados na Figura 7. Note-se um decréscimo visualmente detectável no "splicing" aberrante, juntamente com um aumento correspondente no "splicing" correcto, particularmente quando se usa oligonucleótido 50  $\mu$ M.

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

##### (1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Kole, Ryszard Dominski, Zbigniew T.

(ii) TÍTULO DO INVENTO: Oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras que combatem "splicing" aberrante e métodos para a utilização dos mesmos

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 7

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) DESTINATÁRIO: Kenneth D. Sibley: Bell. Seltzer. Park and Gibson

(B) RUA: Post Office Drawer 34009

(C) CIDADE: Charlotte

(D) ESTADO: North Carolina

- (E) PAÍS: U.S.A.
- (F) CÓDIGO POSTAL: 28234

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete
- (B) COMPUTADOR: PC IBM compatível
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0 Versão #1.25

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO:
- (B) DATA DO PEDIDO:
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE MANDATÁRIO/AGENTE:

- (A) NOME: Sibley, Kenneth D.
- (B) NÚMERO DE REGISTO: 31 665
- (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/DOSSIER: 5470-63

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

- (A) TELEFONE: 919-881-3140
- (B) TELEFAX: 919-881-3175
- (C) TELEX: 575102

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

GUCAGUGCCU AUCA

14

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

AUAGACUAAU AGGC

14

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

CAUUAUUGCC CUGAAAG

17

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

CCUCUUACCU CAGUUAC

17

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

GCUAUUACCU UAACCCAG

18

## (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

## (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

## (ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

## (iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

## (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

GCCUGACCAC CAAC

14

## (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

## (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

## (ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

## (iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

## (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

CCCAAAGACU AUCC

14

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

## (1) INFORMAÇÃO GERAL:

## (i) REQUERENTE:

- (A) NOME: University of North Carolina at Chapel Hill
- (B) RUA: Campus Box 4100
- (C) CIDADE: Chapel Hill
- (D) ESTADO: North Carolina
- (E) PAÍS: U.S.A.
- (F) CÓDIGO POSTAL: 27599-4100

(ii) TÍTULO DO INVENTO: Oligonucleótidos complementares de sequências codificadoras que combatem "splicing" aberrante e métodos para a utilização dos mesmos

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 7

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete
- (B) COMPUTADOR: PC IBM compatível
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Versão #1.25 (EPO)

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:

NÚMERO DO PEDIDO: PCT/US94/05181

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genómico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

GUCAGUGCCU AUCA

14

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genómico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

AUAGACUAAU AGGC

14

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)
- (iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

CAUUAUUGCC CUGAAAG

17

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

CCUCUUACCU CAGUUAC

17

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

GCUAUUACCU UAACCCAG

18

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genômico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

GCCUGACCAC CAAC

14

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: RNA (genómico)

(iv) COMPLEMENTAR DE SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

CCCAAAGACU AUCC

14

Lisboa, 16 de Outubro de 2007

### **REIVINDICAÇÕES**

1. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras para usar como medicamento no combate a "splicing" aberrante numa molécula de pré-mRNA contendo uma mutação,

em que a referida molécula de pré-mRNA possui uma primeira série de elementos de "splicing" que definem um intrão, o qual é removido por "splicing", quando a referida mutação está ausente, para produzir uma primeira molécula de mRNA codificadora de uma proteína nativa;

e em que o referido pré-mRNA ainda possui uma segunda série de elementos de "splicing" induzidos pela referida mutação e que definem um intrão aberrante diferente do referido intrão nativo, intrão aberrante que é removido por "splicing" quando a referida mutação está presente para produzir uma segunda molécula de mRNA aberrante diferente da referida primeira molécula de mRNA;

compreendendo o referido medicamento:

um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras capaz de hibridar com a referida molécula de pré-mRNA para criar uma molécula de dupla hélice em condições que permitem "splicing",

em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras não activa RNase H;

e em que o referido oligonucleótido bloqueia um membro



da referida segunda série aberrante de elementos de "splicing";

de forma a que o referido intrão nativo seja removido por "splicing" e a referida primeira molécula de mRNA codificadora de uma proteína seja produzida, e em que o referido passo de hibridação é realizado numa célula, e em que o referido primeiro mRNA é traduzido na referida proteína nativa.

2. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras bloqueia um elemento de "splicing" com mutação.

3. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras bloqueia um elemento de "splicing" nativo.

4. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras bloqueia um elemento de "splicing" críptico.

5. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras bloqueia um local de "splicing" 5'.

6. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras bloqueia um local de "splicing" 3'.

7. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras bloqueia um ponto de ramificação.

8. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que a referida proteína nativa é  $\beta$ -globina.

9. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que a referida proteína nativa é  $\beta$ -globina humana.

10. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras tem entre 8 e 50 nucleótidos.

11. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras possui modificado um resíduo fosfato de ligação entre dois nucleótidos, seleccionado do grupo

consistindo em metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidas e fosforamidatos.

12. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras possui um nucleótido tendo um substituinte alquilo inferior na sua posição 2'.

13. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras para usar como medicamento na regulação positiva da expressão de uma proteína nativa numa célula, contendo um DNA codificador da referida proteína nativa, DNA que possui uma mutação que causa regulação negativa da referida proteína nativa através do seu "splicing" aberrante,

em que o referido DNA codifica um pré-mRNA;

em que o referido pré-mRNA possui uma primeira série de elementos de "splicing", definindo um intrão nativo, que é removido por "splicing" quando a referida mutação está ausente, para produzir um primeiro mRNA codificador da referida proteína nativa;

e em que o referido pré-mRNA ainda possui uma segunda série de elementos de "splicing" induzidos pela referida mutação e definindo um intrão aberrante diferente do referido intrão nativo, intrão aberrante que é removido pelo "splicing" quando a referida mutação está presente, para produzir um segundo mRNA aberrante diferente do referido primeiro mRNA;

compreendendo o referido medicamento:

um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras que hibrida com o referido pré-mRNA para criar uma dupla hélice em condições que permitem o "splicing", em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras não activa RNaseH; e em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras bloqueia um membro da referida segunda série de elementos de "splicing" aberrante;

de forma a que o referido intrão nativo seja removido por "splicing" e a referida proteína nativa seja produzida.

14. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 13, em que a referida célula é uma célula eucariótica seleccionada do grupo consistindo em células de levedura, insecto e mamífero.

15. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras num veículo aquoso fisiologicamente aceitável para combater "splicing" aberrante *in vivo* numa molécula de pré-mRNA contendo uma mutação, em que a referida molécula de pré-mRNA possui uma primeira série de elementos de "splicing" definindo um intrão nativo, que é removido por "splicing" quando a referida mutação está ausente, para produzir uma primeira molécula de mRNA codificador da referida proteína nativa;

e em que o referido pré-mRNA ainda possui uma segunda série de elementos de "splicing" induzidos pela referida mutação e definindo um intrão aberrante diferente do referido intrão nativo, intrão aberrante que é preferencialmente removido por "splicing", quando a referida mutação está presente, para produzir uma segunda molécula de mRNA aberrante diferente da referida primeira molécula de mRNA; o referido medicamento:

compreendendo o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras um oligonucleótido que:

- (i) hibrida com o referido pré-mRNA para formar uma molécula de dupla hélice;
- (ii) não activa RNaseH; e
- (iii) bloqueia um membro da referida segunda série de elementos de "splicing" aberrantes.

16. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 15, em que o referido oligonucleótido tem entre 8 e 50 nucleótidos.

17. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 15, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras possui modificado um resíduo fosfato de ligação entre dois nucleótidos, seleccionado do grupo consistindo em metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidas e fosforamidatos.

18. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 16, em que o referido oligonucleótido complementar de sequências codificadoras possui um nucleótido tendo um substituinte alquilo inferior na sua posição 2'.

19. Um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 16 numa vesícula lipídica.

20. Utilização de um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 1, para a produção de um medicamento para o tratamento de doença que envolva "splicing" aberrante.

21. Utilização de um oligonucleótido complementar de sequências codificadoras de acordo com a reivindicação 20, em que a referida doença é seleccionada do grupo consistindo em  $\beta$ -talassémia,  $\alpha$ -talassémia, síndrome de Tay-Sachs, fenilcetonúria e fibrose cística.

Lisboa, 16 de Outubro de 2007

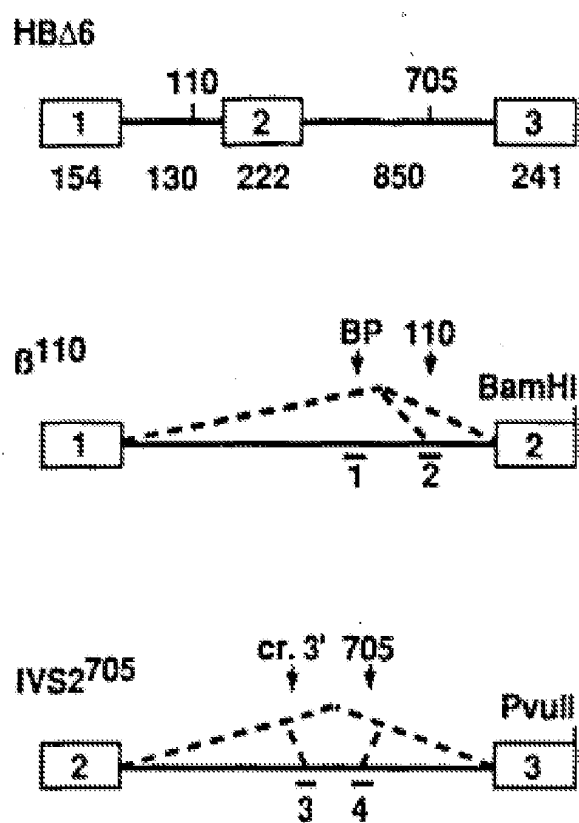


FIG. 1

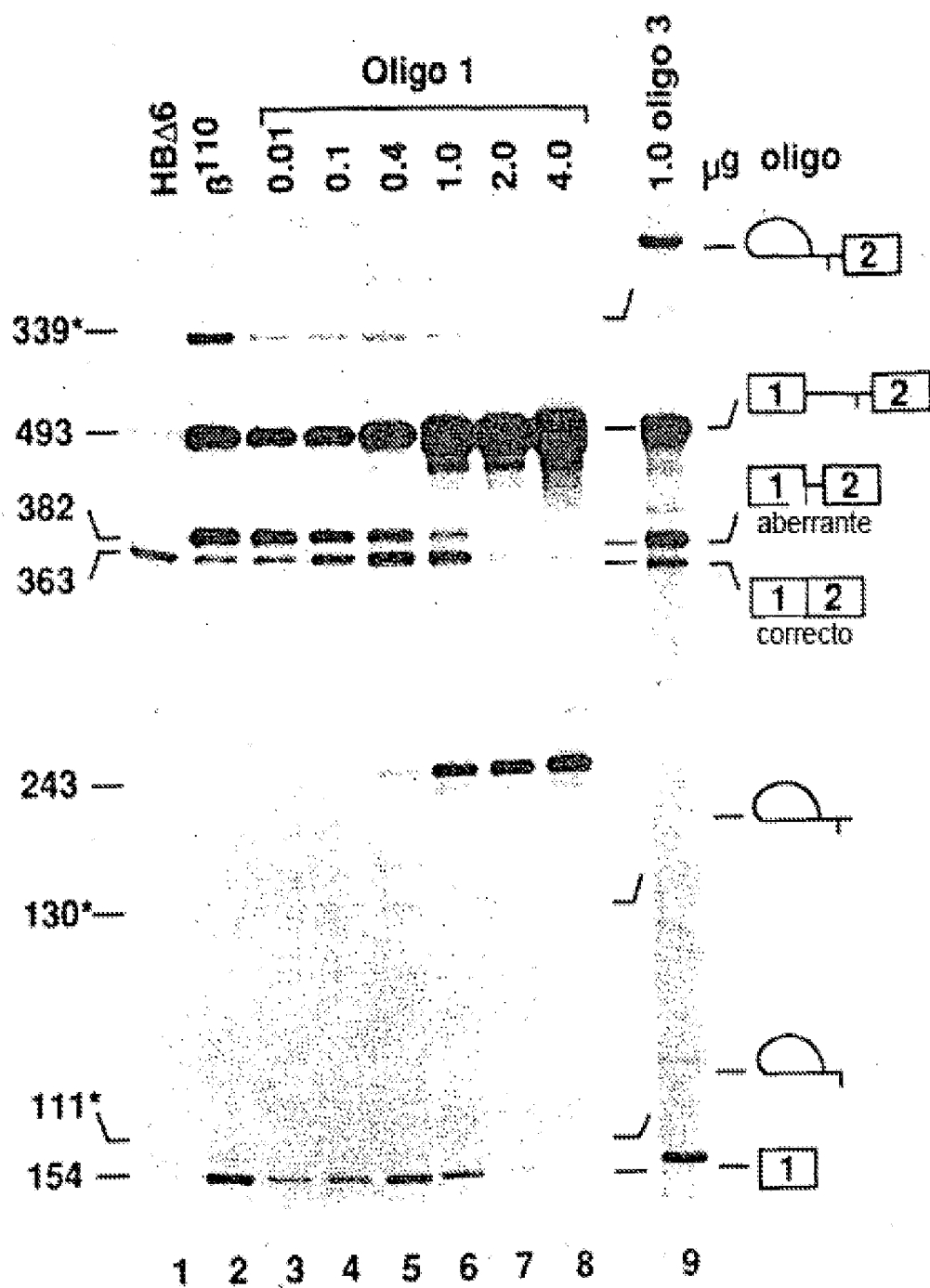


FIG. 2



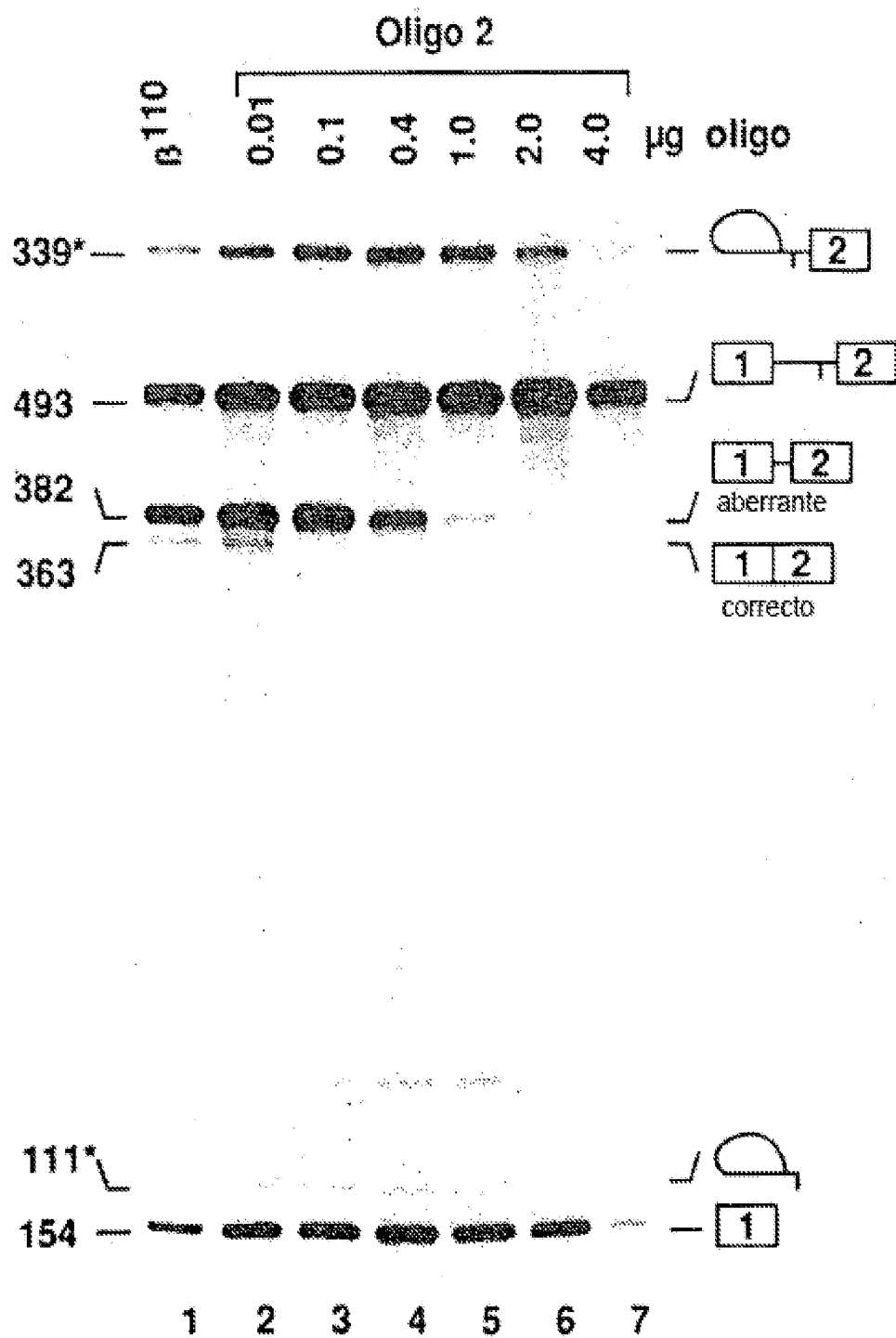


FIG. 3

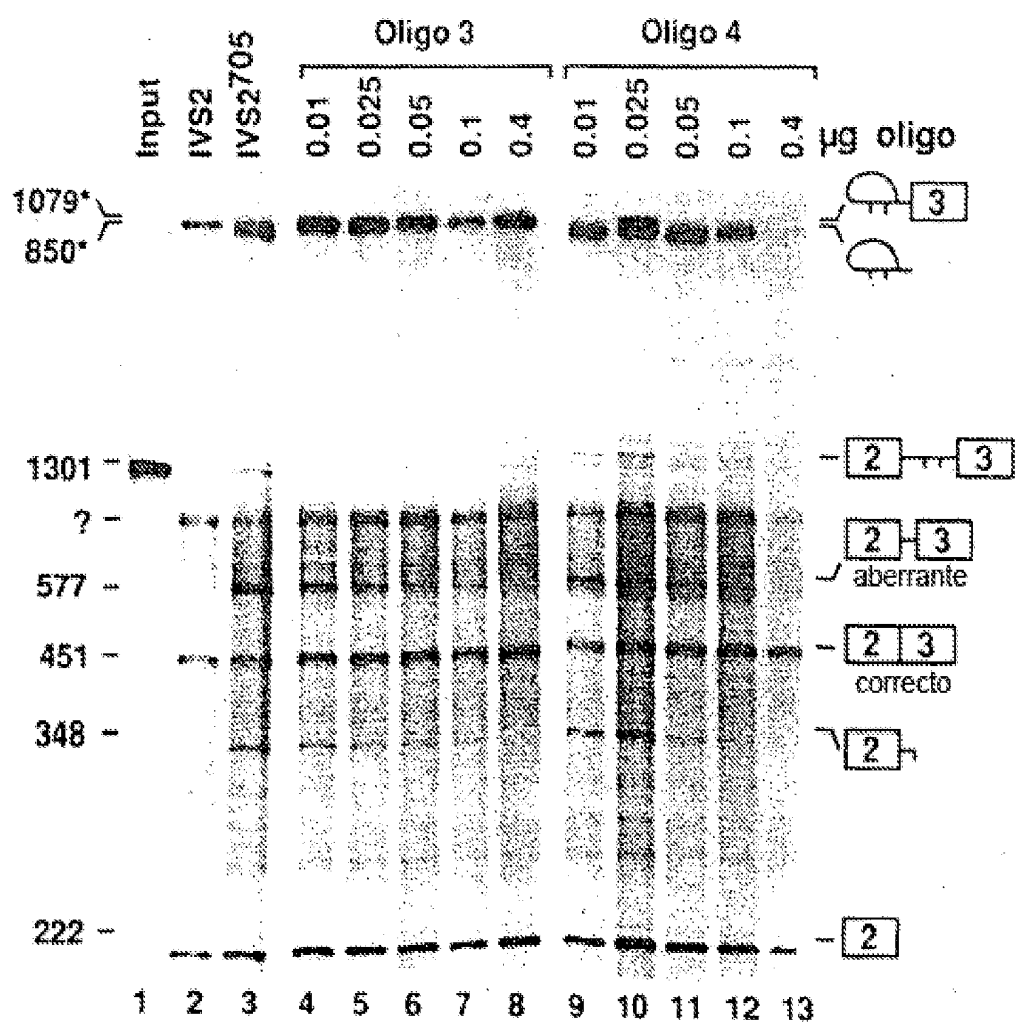
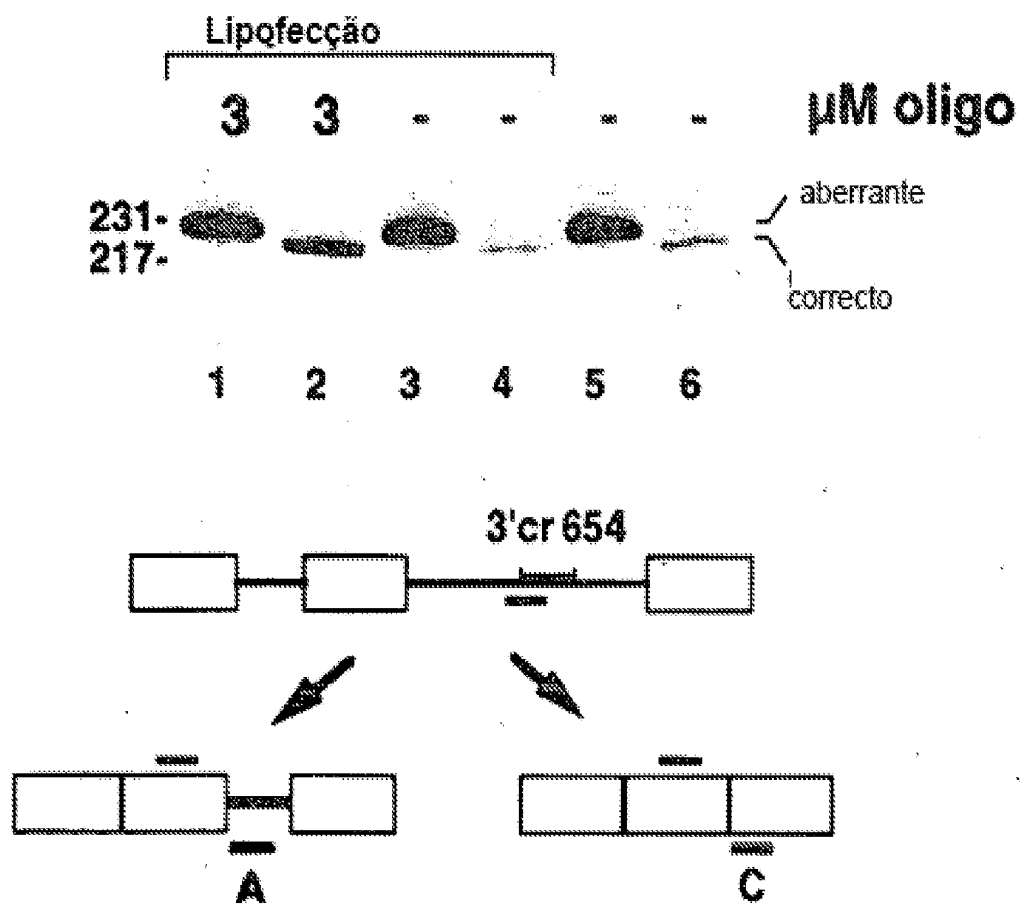
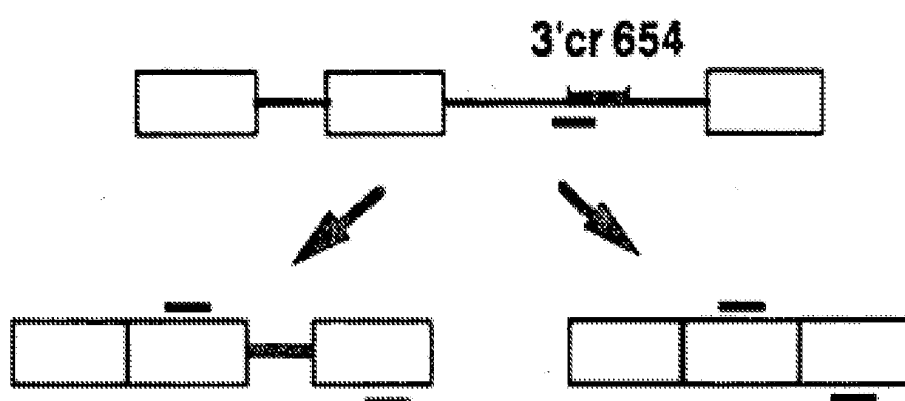
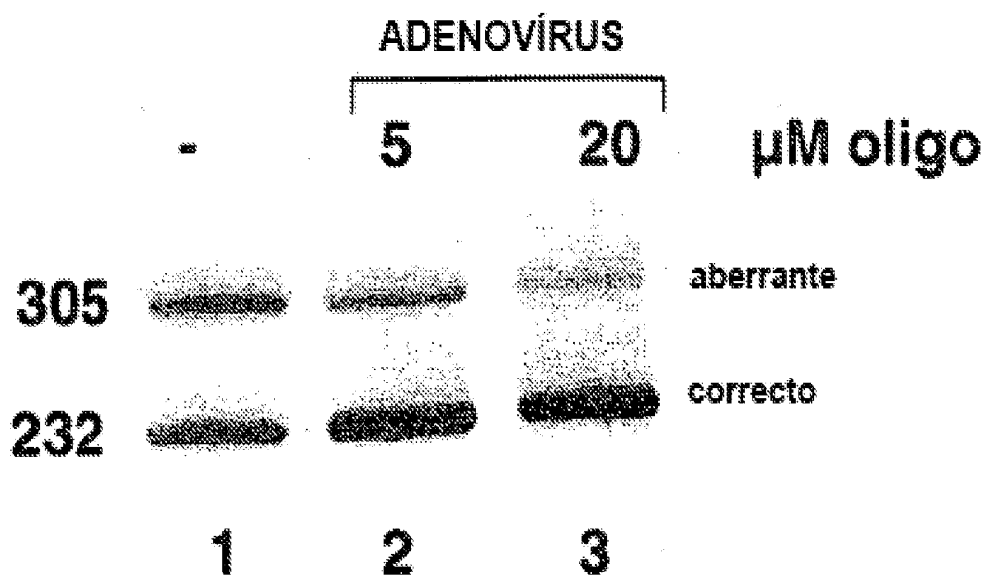


FIG. 4

**FIG. 5**

**FIG. 6**

## Eletroporação

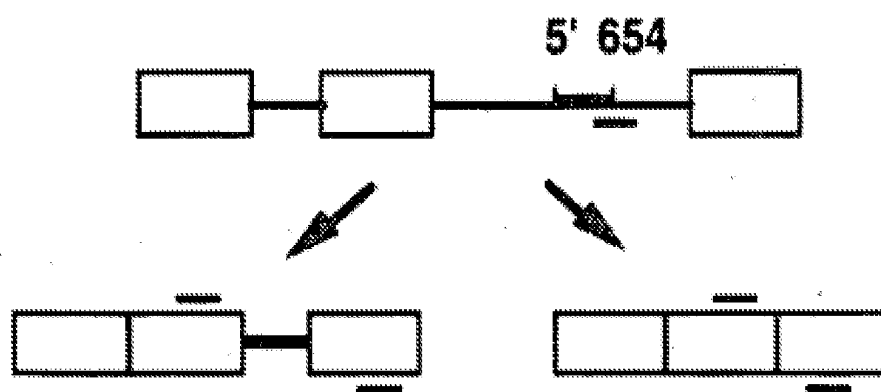
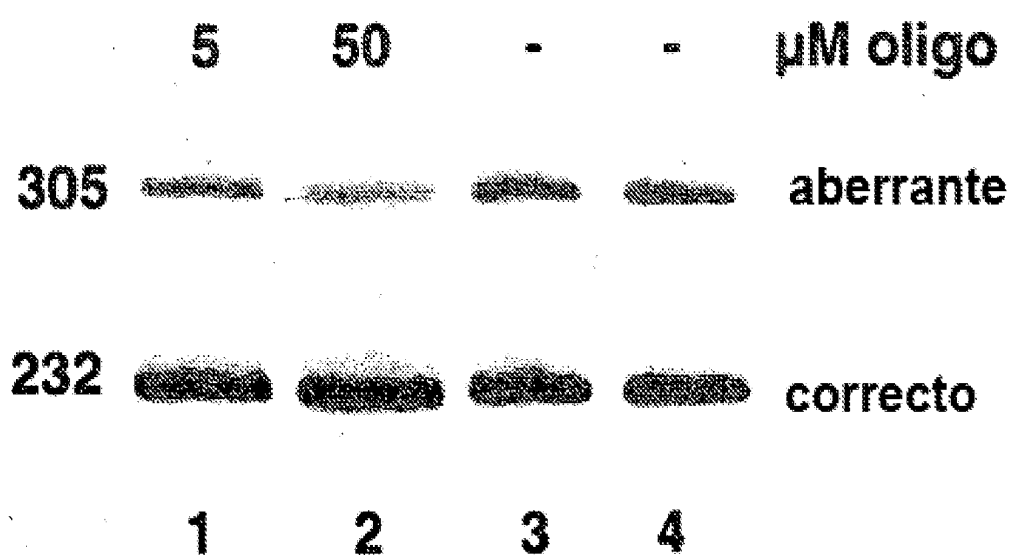


FIG. 7

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. Não faz parte do documento de patente europeia. Apesar da compilação de referências ter sido cuidadosamente preparada, os erros ou omissões não podem ser excluídos e a EPO é alheia a qualquer responsabilidade neste aspecto.*

**Documentos de Patente citados na descrição**

- US 5149797 A, Pederson
- US 4873192 A, T. Kunkel
- US 4880635 A, Janoff
- US 4906477 A, Kurono
- US 4911928 A, Wallach
- US 491795 A, Wallach
- US 4920016 A, Allen
- US 4921757 A, Wheatley
- US 9405181 W

**Literatura fora das patentes citada na descrição**

- M. GHOSH; J. COHEN. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1992, vol. 42, 79
- L. NECKERS et al. *Crit. Rev. Oncog.* 1992, vol. 3, 175
- J. HANVEY et al. *Science*, 1992, vol. 258, 1481
- W. MCSHAN et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 5712
- M. GRIGORIEV et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 3389
- G. DUVAL-VALENTIN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, vol. 89, 504
- P. FURDON et al., *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 9193-9204
- S. AGRAWAL et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 1401-1405
- C. BAKER et al., *Nucleic Acids Res.*, 1990, vol. 18, 3537-3543
- B. SPROAT et al. *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 3373-3386
- R. WALDER; J. WALDER. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5011-5015
- S. AKLI et al. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 7324
- B. DWORNICZAK et al., *Genomics*, 1991, vol. 11, 242
- L-C. TSUI. *Trends in Genet.*, 1992, vol. 8, 392
- M. KONARSKA et al. *Cell*, 1984, vol. 38, 731
- A. KRAINER et al. *Cell*, 1984, vol. 36, 993
- R. SPRITZ et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 2455
- T. KUNKEL et al. *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 154, 367

- BUSSLINGER et al. *Cell*, 1981, vol. 27, 289
- Y. FUKUMAK et al. *Cell*, 1982, vol. 28, 585
- R. REED; T. MANIATIS. *Cell*, 1985, vol. 41, 95
- Y. ZHUANG; A. WEINER. *Genes and Dev*, 1989, vol. 3, 1545
- H. INOUE et al. *Nucleic Acids Res.*, 1987, vol. 15, 6131
- H. INOUE et al., *FEBS Lett*, 1987, vol. 215, 327
- B. SPROAT et al., *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 3373
- Z. DOMINSKI; R. KOLE. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, vol. 12, 2108
- C. DOBKIN; A. BANK. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, 16332
- B. RUSKIN; M. GREEN. *Cell*, 1985, vol. 43, 131
- Current Protocols in Molecular Biology. 1987
- Z. DOMINSKI; R. KOLE. *Mol. Cel. Biol.* 1991, vol. 11, 6075-6083
- Z. DOMINSKI; R. KOLE. *Mol. Cel. Biol.* 1992, vol. 12, 2108-2114
- C. BENNETT et al. *Mol. Pharm*, 1992, vol. 41, 1023-1033