

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.05.06	(73) Titular(es): UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"	
(30) Prioridade(s): 2002.05.08 IT RM20020253	PIAZZALE ALDO MORO 5 00185 ROMA	IT
(43) Data de publicação do pedido: 2005.02.02	(72) Inventor(es): I. BOZZONI	IT
(45) Data e BPI da concessão: 2009.11.18 036/2010	F.G. DE ANGELIS	IT
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA	
	RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MOLÉCULAS DE ARNRP (SNRNA) QUIMÉRICAS PORTADORAS DE SEQUÊNCIAS ANTI-SENTIDO CONTRA AS JUNÇÕES DE SPLICING DO GENE DA DISTROFINA E SUAS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

(57) Resumo:

RESUMO

"Moléculas de ARNnp (snRNA) quiméricas portadoras de sequências anti-sentido contra as junções de *splicing* do gene da distrofina e suas aplicações terapêuticas"

Descreve-se um gene que codifica para um ARNnp (ARN nuclear pequeno ou, snRNA, do inglês "*small nuclear RNA*") modificado de modo a conter uma sequência anti-sentido complementar a pelo menos uma das duas junções de *splicing* a 5' e/ou a 3' de um dos exões que codificam para uma proteína de interesse terapêutico, sequência essa que deverá ser omitida (por "*skipping*") durante o processo de *splicing* que converte o pré-ARNm no ARNm maduro. É particularmente vantajoso o gene que contém segmentos complementares a ambas as junções de *splicing*. Se introduzido em vectores apropriados, o gene é útil em terapia génica, particularmente no tratamento de Distrofias Musculares de Duchenne, doenças distróficas.

DESCRIÇÃO**"Moléculas de ARNnp (snRNA) quiméricas portadoras de sequências anti-sentido contra as junções de *splicing* do gene da distrofina e suas aplicações terapêuticas"**

A presente invenção refere-se a moléculas quiméricas de ARNnp (ARN nuclear pequeno, ou snRNA, do inglês "*small nuclear RNA*") portadoras de sequências anti-sentido contra as junções de *splicing* do gene da distrofina e suas aplicações terapêuticas. Em particular, a invenção refere-se a moléculas quiméricas capazes de mascarar as junções de *splicing* de exões mutados induzindo desse modo a sua omissão ("*skipping*") a partir de ARNm maduro. O transcrito resultante irá então produzir uma proteína distrofina mais curta, mas funcional. Estas moléculas podem ser utilizadas na terapia génica de muitas formas de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

A DMD é uma desordem recessiva ligada ao cromossoma X que afecta 1 em cada 3500 machos. É caracterizada pela ausência da distrofina do citosqueleto (proteína de 427 kDa) que por sua vez produz uma deterioração grave e progressiva dos músculos. A maioria das mutações da DMD consiste em deleções e mutações pontuais no gene de 2,5 Mb da distrofina que introduzem codões de *stop* e mutações no gene de 2,5 Mb da distrofina que introduzem codões de *stop* e consequentemente a terminação prematura da tradução. Numa forma mais moderada de miopatia, a Distrofia Muscular de Becker (BMD), deleções no interior do gene produzem ARNm em enquadramento e consequentemente proteínas distrofina mais curtas mas semi-funcionais (1). Como um terço dos casos de DMD resultam de mutação *de novo* (2,3), a doença pode nunca ser erradicada através de rastreio genético e aconselhamento. A necessidade de desenvolver estratégias de tratamento para esta desordem é evidente. Uma envolve a transplantação de mioblastos normais nos tecidos musculares a que falta esta proteína (4,5), enquanto outras tentam restabelecer a expressão correcta de distrofina através de uma abordagem de terapia génica que entregue cópias de ADNc de comprimento completo ou de mini-ADNc da distrofina nas células que possuem o gene mutado (6-8). Embora esta abordagem seja muito promissora, vários problemas permanecem ainda por

resolver, tais como capacidade de dimensão e actividade de transdução do vector e resposta imunitária ao gene "terapêutico" (9).

Outra abordagem de terapia génica é baseada no facto das deleções internas em enquadramento na proteína produzirem apenas sintomas miopáticos moderados; portanto, deverá ser possível, prevenindo a inclusão de exão(ões) mutados específicos no ARNm da distrofina maduro, restabelecer um fenótipo parcialmente corrigido. A este respeito, é interessante notar que o restabelecimento dos níveis de distrofina apenas em 30% é suficiente para um benefício terapêutico substancial (10).

A omissão ("*skipping*") específica de exões foi conseguida através da entrega extracelular de 2'-O-metil-oligonucleótidos anti-sentido sintéticos criados contra junções de *splicing* específicas (11-13) ou potenciadores exónicos (10). A interacção do ARN anti-sentido com a correspondente sequência-alvo deverá mascarar a utilização de locais de *splicing* específicos ou prevenir a ligação de factores potenciadores durante a reacção de *splicing* e determinar a omissão do(s) exão(ões) mutados vizinhos de modo a produzir um ARNm de distrofina em enquadramento, sendo o efeito final a produção de uma proteína distrofina mais curta mas funcional. Uma desvantagem significativa para a abordagem dos oligonucleótidos sintéticos é de que requereria administrações periódicas.

Para evitar este problema, os autores da invenção desenvolveram vectores capazes de expressar *in vivo*, de uma maneira estável e contínua, grandes quantidades de ARN quiméricos contendo sequências anti-sentido. Esta estratégia foi testada na deleção humana dos exões 48-50, mas os peritos podiam aplicá-la também a outros exões do gene da distrofina. Neste caso, é produzido um codão de terminação prematuro no exão 51; se for obtida a omissão deste exão, o resultado será um ARNm em enquadramento.

As sequências anti-sentido clonadas em vectores de ARNnp podem ser desenhadas para emparelhar com qualquer região de um transcrito celular. Em princípio, se existirem sequências que

têm que ser reconhecidas por maquinarias celulares específicas a sua mascaramento por ARN anti-sentido deverá interferir com processos específicos.

Como os ARNnp estão localizados no núcleo, apenas podem afectar processos nucleares.

Os ARN anti-sentido podem afectar o *splicing* através de interacção com dois tipos de sequências:

a) *locais de splicing*. ARN anti-sentido contra locais de *splicing* pode induzir, durante o *splicing*, a omissão de um exão específico.

b) *potenciadores de splicing*. Muitos exões humanos, de grande dimensão ou com locais de *splicing* flanqueadores relativamente fracos, contêm sequências que promovem a sua utilização, os denominados potenciadores de *splicing* exónicos (ESE, do inglês "*Exonic Splicing Enhancers*"). Estas sequências são reconhecidas por proteínas ricas em serina/arginina (SR) que promovem a utilização de exões em tecidos onde são expressos. Os ARN anti-sentido que obscurecem estes potenciadores de *splicing* podem ser desenhados de modo a que o exão seja omitido e não incluído no ARNm maduro. Relativamente ao direccionamento para sequências de locais de *splicing* a 3' e 5' que podem causar uma omissão menos previsível de exões adjacentes adicionais, o *knock out* de potenciadores exónicos produz um efeito muito específico e mais reprodutível apenas nos intrões flanqueadores.

O direccionamento de locais de *splicing* ou potenciadores exónicos pode ser aplicado em todos os casos onde a omissão de um exão mutado específico possa restabelecer a funcionalidade do ARNm (tal como no caso de mutações de distrofina).

Como mais de metade dos genes humanos codificam transcritos que sofrem *splicing* alternativo, os métodos gerais para controlar a expressão de isoformas de *splicing* alternativo particulares de genes específicos seriam úteis numa ampla variedade de aplicações. Os ARN anti-sentido contra junções de *splicing* específicas podem controlar o tipo de ARNm de *splicing* alternativo produzido e da proteína correspondente.

Os ARN anti-sentido podem também ser aplicados para interferir com os seguintes processos:

1) formação da extremidade 3' de ARNm. Este processo requer uma aparelhagem complexa de proteínas que através do reconhecimento de sequências conservadas específicas presentes na UTR a 3' determina a clivagem do transcrito nascente e a adição da cauda poliA. Mascarar as sequências reconhecidas pelas componentes de clivagem/poliadenilação ou o local de clivagem deverá prevenir a formação da extremidade 3' e assim produzir uma leitura contínua (*"read-through"*) para as sequências a jusante. Os ARN de leitura continuada são rapidamente conduzidos para a via degradativa pois não possuem a cauda poliA. A estratégia anti-sentido neste caso deverá diminuir drasticamente a abundância de um ARNm específico. Esta estratégia é também útil nos casos onde estão presentes locais de clivagem/poliadenilação alternativos no mesmo gene. A omissão de um dos locais alternativos pode controlar o tipo de transcrito produzido.

2) edição. A edição do ARN é um processo nuclear pós-transcrição que consiste na modificação específica do local do ARNm. Os factores específicos, que interactuam com o ARN, são responsáveis por estas modificações. Também neste caso mascarar o substrato deverá prevenir a ocorrência da edição, desse modo alterando a capacidade de codificação do ARNm.

De modo a obter moléculas de ARN "terapêuticas" eficazes *in vivo*, foram considerados vários parâmetros importantes. Não apenas os genes para estes ARN têm que ser clonados sob promotores eficientes que produzem níveis elevados de expressão como, em adição, o contexto do ARN em que o ARN terapêutico está envolvido deverá proporcionar estabilidade e uma localização subcelular específica. O último ponto é um ponto crucial pois os ARN nas células estão atribuídos a localizações celulares específicas (núcleo, nucléolo, citoplasma, RNP livres e ligados a polissomas, etc.) e apenas pode ser obtida uma actividade eficiente da molécula terapêutica se a co-localização com o alvo estiver assegurada (15,33,34). ARN celulares pequenos têm sido utilizados vantajosamente como vectores pois são normalmente transcritos

a partir de promotores fortes (polIII ou polIII) e porque permitem a entrega das construções quiméricas em compartimentos celulares específicos (15,26,30,32,33).

Os autores utilizaram diferentes ARN nucleares pequenos e os seus correspondentes genes para expressar no núcleo moléculas quiméricas portadoras de sequências anti-sentido complementares a junções de *splicing* do exão 51 e testaram a sua actividade em mioblastos de pacientes de DMD com uma deleção dos exões 48-50. A junção de *splicing* é uma região que atravessa o local de *splicing* e compreende as sequências a montante e a jusante do local. Os resultados obtidos mostraram que a combinação de moléculas anti-sentido contra as junções de *splicing* a 5' e 3' induziu uma eficiente omissão do exão 51 e a recuperação parcial da síntese de distrofina. A escolha dos ARN transportadores foi ditada pela possibilidade de co-localização das moléculas anti-sentido com o seu ARN alvo. Dois dos ARN seleccionados, U1 e U2, sabe-se que participam na reacção de *splicing*, desse modo aumentando a probabilidade da molécula anti-sentido ser entregue ao compartimento onde está localizado o pré-ARNm da distrofina. Nesta técnica o ARNnp U7 nucleoplasmático foi previamente utilizado para expressar moléculas anti-sentido *in vivo* e para dirigir a omissão de exões de um gene de beta-globina mutante (32). Contudo, sabe-se que o promotor do gene ARNnp U7 é menos activo (17,35,36). Os autores da invenção seleccionaram os ARNm U1 e U2 em vez daquele, porque dirigem moléculas anti-sentido especificamente e selectivamente no compartimento de *splicing*, desse modo melhorando a co-localização com a molécula-alvo. Em adição, os vectores da invenção atingem tanto os locais de *splicing* a 5' como a 3'. Finalmente, o gene da globina representa um sistema de expressão e síntese que difere do da distrofina.

A análise de linhas celulares derivadas de um paciente distrófico, imortalizadas com um T grande de SV40, e transduzidas estavelmente com vectores retrovirais portadores das diferentes construções, indica que se obtém a omissão eficiente quando duas moléculas anti-sentido específicas para as junções de *splicing* a 5' e 3' do exão 51 são co-expressas na mesma célula. Observa-se um efeito menor quando são utilizadas moléculas anti-sentido individuais. Nas células em

que se observa omissão do exão 51, obtém-se a recuperação da síntese de distrofina.

É portanto um objecto da presente invenção proporcionar um gene codificando um ARNnp de U1 humano modificado em que o fragmento do gene a 5' de U1 que transcreve a região de U1 que é de cadeia simples compreende uma sequência anti-sentido complementar às junções de *splicing* a 5' e 3' de pelo menos uma sequência de exão do pré-ARNm da distrofina, de modo a que pelo menos uma sequência de exão do pré-ARNm da distrofina seja omitido durante o processo de *splicing* que converte o pré-ARNm no ARNm maduro.

Preferivelmente, o ARNnp de U1 modificado é adicionalmente modificado de modo a que seja eliminado o fragmento do gene de U1 que transcreve a sequência de ARN que interactua com a proteína de 70k associada a U1.

Na invenção, pelo menos o exão 51 do pré-ARNm da distrofina pode ser omitido.

É um outro objecto da invenção proporcionar um ARNnp de U1 humano modificado transcrito pelo gene da invenção como descrito acima.

É um outro objecto da invenção proporcionar um vector para a expressão estável e eficiente em células-alvo que expressam distrofina que transcrevem o ARNnp de U1 humano modificado como descrito acima. O vector pode ser um vector retroviral, adenoviral ou viral adeno-associado. Preferivelmente, o vector é adequado para transferir para células estaminais ou para células de fibras musculares.

A invenção proporciona também um gene, um ARNnp de U1 humano modificado ou um vector da invenção como descrito acima, para utilização num método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia.

É também proporcionado pela invenção um gene, um ARNnp de U1 humano modificado ou um vector de acordo com a invenção como descrito acima para utilização no tratamento de Distrofia Muscular de Duchenne.

A invenção proporciona ainda a utilização de um gene, um ARNnp de U1 humano modificado ou um vector de acordo com a invenção como descrito acima no fabrico de um medicamento para utilização no tratamento de Distrofia Muscular de Duchenne.

Os segmentos do vector capazes de assegurar a expressão estável e eficiente do gene para o ARNnp modificado de acordo com o método da invenção serão seleccionados por um perito na especialidade de acordo com a célula-alvo. Se células de fibras musculares forem o alvo, aqueles compreendem porções retrovirais, adenovirais adeno-associadas, lentivirais, etc.

Vantajosamente, em comparação com a técnica anterior que utiliza oligonucleótidos anti-sentido, a omissão do exão mutado e o restabelecimento da síntese da distrofina são características que as células transduzidas adquirem permanentemente, desse modo evitando a necessidade de uma administração contínua para conseguir um efeito terapêutico. Os vectores da invenção portanto representam uma ferramenta para o desenvolvimento de estratégias para a entrega *in vivo* de ARN terapêuticos, por manipulação do ARN anti-sentido no interior dos vectores que se transduzem eficientemente nas células de fibras musculares, como, por exemplo, os vectores derivados de retrovírus, tais como lentivírus, adenovírus ou vírus adeno-associados.

A invenção é adiante descrita em relação a exemplos experimentais não limitantes e em referência às figuras seguintes:

Figura 1. Representação esquemática da mutação da distrofina utilizada neste estudo. O paciente 491A tem uma deleção que abrange do exão 48 ao 50. Topo: mostra-se o *splicing* do pré-ARNm transcrito a partir deste gene mutante (os exões estão representados por caixas e os intrões por linhas): é produzido um ARNm fora-do-quadro com um codão de *stop* no exão 51. Direita: a deleção do exão 51 do ARNm produz um ARNm funcional que codifica para uma proteína mais curta de 217 aminoácidos. Os ARN anti-sentido dirigidos contra junções de *splicing* do exão 51 estão também esquematicamente representadas em relação ao seu substrato alvo. Painel A) A

construção U1-5' foi obtida substituindo a região complementar a junções de *splicing* a 5' (nucleótidos nas caixas) por uma sequência anti-sentido contra a junção de *splicing* a 5' do exão 51. Painel B) Estrutura dos derivados de U2. O ARNnp de U2 foi inicialmente convertido na construção U2mod que foi, por sua vez, modificada para originar U2BP. A sequência da porção a 5' do ARNnp de tipo selvagem e de derivados de U2 (nucleótidos 1-52) está mostrada no painel superior juntamente com a dos nucleótidos complementares do ARNnp de U6. As regiões em caixas indicam as substituições de nucleótidos introduzidas, enquanto os emparelhamentos com U6 estão indicados por barras. A região de 14 nucleótidos de comprimento de U2, indicada em itálico, contendo a região de emparelhamento de locais de ramificação, foi eliminada em U2mod. Em U2BP esta região foi substituída por uma sequência de 28 nucleótidos de comprimento, complementar à região a 3' contendo o local de ramificação do intrão 50 (sublinhado). As modificações de U2mod foram feitas de modo a manter a estrutura secundária global (veja-se a representação esquemática no painel inferior), enquanto impedindo o emparelhamento com o ARNnp de U6.

Figura 2. Expressão *in vivo* das construções anti-sentido. 8 microgramas de ARN total, extraído de populações de células mistas transduzidas com os diferentes vectores pBabe quiméricos (indicado acima das pistas) e de células de controlo não transduzidas (pistas 491A), foram corridos em géis de poliacrilamida a 6%/ureia 7M e electrotransferidos para membranas de *nylon*. As hibridações foram realizadas com oligonucleótidos marcados com ³²P específicos para cada ARN anti-sentido, como indicado por baixo de cada painel. Pista M: marcador de peso molecular (ADN plamídico de pBR322, digerido com MspI).

Figura 3. O efeito da construção anti-sentido U2 sobre o *splicing*. Os oócitos foram injectados com plasmídeos contendo U2h ou U2-BP, como indicado na secção "Materiais e Métodos". Os núcleos dos oócitos individuais foram isolados manualmente e o ARN foi extraído. As amostras foram separadas em géis de poliacrilamida a 6%/ureia 7M e transferidas. A autorradiografia directa do filtro mostra ARN marcados com ³²P (Painel A), enquanto as hibridações contendo sondas

específicas permitem a análise da expressão dos plasmídeos injectados (Painéis B e C). Em B) utilizou-se uma sonda anti-sentido específica, e em C) uma sonda para ARNnp de U2. O ARNnp de U2h acumula-se nos oócitos principalmente como um precursor alguns nucleótidos mais longo (banda U2h). Os diferentes produtos de *splicing* estão mostrados de lado. Pista M: pBR322 digerido com MspI.

Figura 4. Análise dos efeitos da construção anti-sentido sobre o padrão de *splicing* do ARNm da distrofina. A parte superior dos painéis mostra os oligos utilizados para as reacções *nested RT-PCR* do pré-ARNm da distrofina de 491A. A RT-PCR foi realizada com os oligos externos; após 40 ciclos de amplificação, realizou-se a *nested PCR* com os internos. Os produtos de amplificação de linhas celulares não tratadas (pistas 491A) e transduzidas (o nome da construção anti-sentido específica está indicado por cima de cada pista) foram corridos em géis de agarose a 2% em paralelo com um controlo de RNA-menos (pistas-) e com os produtos de amplificação obtidos com ARN de uma linha celular de músculo-esquelético de tipo selvagem (pista SMC). O produto de amplificação de 501 nucleótidos de comprimento corresponde ao ARN de 491A sem omissão, enquanto o fragmento de 268 nucleótidos de comprimento corresponde ao ARN com omissão. Na pista SMC, o produto de amplificação com 898 nucleótidos tem o tamanho esperado para um ARNm de distrofina do tipo selvagem. Pista M: escada de ARN de 100pb (Invitrogen).

Figura 5. Análise dos efeitos de construções duplas anti-sentido sobre o padrão de *splicing* do ARNm da distrofina. Painel A): representação esquemática da construção retroviral pBabe puro. As cassetes de expressão anti-sentido foram clonadas cabeça-com-cauda na LTR a 3' e orientação directa. O vector 5'/BP contém construções U2BP e U1-5'. Painel B): realizou-se a análise *Northern blot* com 8 microgramas de ARN total extraído de células 491A não transduzidas (pistas 491A) ou transduzidas com o vector 5'/BP (Pista: 5'/BP). A hibridação foi realizada com os oligonucleótidos marcados com ³²P indicados adiante. Pista M: marcador de peso molecular (ADN do plasmídeo pBR322, digerido com MspI). Painel C): realizou-se a *nested RT-PCR* com ARN de células de controlo não transduzidas (pista 491A) e de células transduzidas com a

construção dupla 5'/BP. Realizou-se uma amplificação de controlo na ausência de ARN (pista -). Pista M: escada de ARN de 100pb (Invitrogen). A representação esquemática dos produtos sem omissão e com omissão está apresentada ao lado do gel. Na parte inferior do painel, a sequência dos produtos de RT-PCR mais curtos apresenta a omissão precisa do exão 51.

Figura 6. Análise *Western blot*. 100 microgramas de proteínas totais extraídas de células 491A não transduzidas (pistas 491A) ou transduzidas com o vector 5'/BP foram corridos num gel de poliacrilamida a 6%-SDS em paralelo com proteínas extraídas de células de músculo-esquelético do tipo selvagem (pista SMC). A dimensão da proteína distrofina está indicada ao lado.

Materiais e Métodos

Construções plasmídicas

O clone U1-5' foi obtido por PCR inversa no plasmídeo pHU1-ID, contendo a totalidade do gene humano de ARN de U1, com os oligos:

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

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

A cassette de expressão de U1 foi construída por PCR inversa, com os oligonucleótidos:

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

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

Nesta construção, a região de codificação do ARNnp de U1 (do nt 3 ao 161) foi substituída pelos locais de restrição KpnI, StuI e Xho.

O gene humano de ARNnp de U2 (Fig. 1B), incluindo o promotor e as sequências a 3' a jusante, foi utilizado para gerar por PCR inversa a construção U2mod com os oligonucleótidos:

U2mA, 5'- AAAGGCTGTCTTCGCATGCGCTCGCCTTCGCGCCC-3';

U2mB, 5'- TGGCTATCTCTCGAGTATCAGTTTAATATCTGATAC-3'.

A construção U2BP foi derivada de U2mod por PCR inversa com os oligonucleótidos:

U2X: 5'-CTCGAGAGATAGCCAAAAGGCTGTCTTCGCATGCGCTCGCC-3';

U2BP: 5'-AAAAAGAAGAAAAAGAAAAATTAGAACTATCAGTTTAATATCTGATACG-3'.

Construções retrovirais

Construções simples anti-sentido

Amplificou-se o U2BP por PCR directa utilizando os oligonucleótidos:

U2cas up 5'-CTAGCTAGCCAGGCCTTCGGCTTCTTCGACTGGG-3';

U2cas down 5'-CTAGCTAGCGCGCGTCACAGGACTCGTGCAAGCC-3'.

Os fragmentos resultantes foram clonados na orientação directa no local NheI do vector retroviral pBabe puro (23). Os fragmentos BamHI contendo a totalidade da construção quimérica U1-5' foram inseridos no local NheI de pBabe modificado com adaptadores BglII.

Construções duplas anti-sentido

A construção 5'/BP foi preparada por clonagem do fragmento BamHI contendo a região de codificação de U1-5' no interior do plasmídeo U2BP. Esta construção foi amplificada com os oligos U2cas up e U1cas down e clonada no local NheI do vector pBabe.

Linha celular de empacotamento

A linha celular de empacotamento Phoenix (<http://www.stanford.edu/nolan>) foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com FCS a 10% e 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO/BRL). Recolheram-se as partículas retrovirais a partir das células Phoenix transientemente transfectadas com 4 µg das várias construções pBabe utilizando LipofectAmine plus (GIBCO/BRL) e utilizaram-se para transduzir a linha celular do paciente com DMD.

Cultura celular

A biópsia derivada de Duchenne (491A) foi colocada em cultura e mantida em RPMI suplementado com 15% de FCS, 1% de

penicilina-estreptomicina e 1% de glutamina (GIBCO/BRL). As células foram propagadas por tripsinização padrão e semeadas directamente numa placa revestida de colagénio (colagénio da cauda de rato de Tipo 1, BD). A infecção das células foi realizada na ausência de qualquer antibiótico. Um dia antes da infecção as células foram plaqueadas a uma densidade de aproximadamente 5×10^5 células por placa de 100mm. Foram realizados dois ciclos de infecções com os diferentes sobrenadantes virais; 48 h após a infecção as células foram divididas e foi adicionada puromicina na concentração final de 1 mg/ml (Sigma).

Preparação e análise do ARN

O ARN celular total foi preparado utilizando o sistema de isolamento de ARN Ultraspec (BIOTECX Laboratories, INC.) de acordo com o protocolo do fabricante. Para a análise *Northern Blot* carregaram-se 8µg de ARN total em géis de poliacrilamida a 6% - ureia 7M transferiram-se e hibridaram-se com as seguintes sondas anti-sentido específicas:

U1a 5'-ATCAAGCAGAAGGTATGAGAAAA-3';

U2a 5'GTTTCTAATTTTCTTTTCTTC-3'.

Realizou-se a RT-PCR com 200ng de ARN total em 40 ciclos de amplificação utilizando o sistema de RT-PCR Access (Promega). A primeira amplificação foi realizada com os iniciadores:

E46F, 5'-GAATTTGTTTTATGGTTGGAGG-3 ;

E54F, 5'-CTTTTATGAATGCTTCTCCAAG-3'.

Utilizaram-se dois microlitros do produto de RT-PCR como molde numa *nested PCR* secundária de 50µl utilizando os oligos:

E47F, 5'-TTACTGGTGGAAGAGTTGCC-3' (exão 47) e

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

A *nested PCR* foi realizada em 30 ciclos. Os produtos *nested* foram analisados em gel de agarose a 2,5% e bandas específicas foram purificadas para análise da sequência utilizando o *Kit* de extracção QIAquick Gel (Qiagen). A sequenciação do ADN foi realizada por M-medical utilizando o *kit* BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE

Applied Biosystems) e analisada num sequenciador ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems).

Micro-injecções em oócitos de *X. laevis*

O pré-ARN de AdMI tem 253 nucleótidos de comprimento e compreende uma parte do transcrito de princípio tardio do Adenovírus. É obtido por transcrição *in vitro* do plasmídeo pAdML-D11 digerido com ScaI (38). Os ARN de AdML marcado com ^{32}P e U6 ($1,5 \times 10^6$ e $0,4 \times 10^6$ cpml/ μl , respectivamente) foram co-injectados em oócitos que tinham recebido na noite anterior os plasmídeos U2-BP ou U2h (4 ng/oócito). Após incubação durante 1 h, o ARN foi extraído e analisado num gel de poliacrilamida a 6% - ureia.

Análise Western Blotting

Lavaram-se as células cultivadas duas vezes com tampão salino de fosfato (PBS) gelado e depois lisaram-se durante 40' a 4°C num tampão contendo Tris 500 mM-HCl a pH 8, NaCl 150 mM, NaF 100 mM, EGTA 1 mM, MgCl_2 1,5mM, Triton X-100 a 1%, glicerol a 10% e suplementado com vários inibidores de protease (leupeptina, PMSF, apoproteína). Após clarificação por centrifugação a 15 300 rpm durante 10', quantificou-se o teor de proteína por Ensaio de Proteína da BIO-RAD (BIO-RAD). Separaram-se 100 microgramas de proteínas num gel de poliacrilamida a 6% contendo SDS a 0,1%, Tris-HCl 150 mM, pH 8,8 e transferiram-se para membrana de transferência polyscreen PVDF (Nen Life Science). Após tratamento com leite desidratado não gordo a 5% em Tween salino tamponado com Tris (TBS-T), incubou-se a membrana com anticorpo monoclonal de ratinho NCL-DYS1 (Novocastra Laboratories Ltd) diluído de 1:100 durante 60', seguindo-se três lavagens com tampão TBS-T e incubação com um anticorpo secundário ligado a peroxidase de rábano (1:1000; Amersham Pharmacia Biotech) durante 45'. A detecção de proteínas foi realizada com substrato quimioluminescente de super-sinal (PIERCE).

Resultados

Construção dos ARN quiméricos anti-sentido

Dos casos disponíveis os autores seleccionaram um, o paciente 491A, possuindo uma deleção que abrange os exões 48,

49 e 50 (Ricci e Galluzzi, comunicação pessoal). Neste caso, a omissão do exão 51 iria produzir um ARNm de codificação em enquadramento para uma proteína 210 aminoácidos mais curta do que a distrofina do tipo selvagem (Fig.1, topo).

O ARNnp de U1 foi manipulado de modo a substituir 8 nucleótidos no seu terminal 5' por uma sequência de 24 nucleótidos de comprimento complementar à região correspondente que atravessa a junção de *splicing* do exão/intrão 51 (construção U1-5'; Fig. 1A). Esta escolha foi ditada pelo facto de que a região terminal a 5' do ARNnp de U1 está normalmente numa conformação de cadeia simples e está envolvida no reconhecimento da junção de *splicing* a 5' dos pré-ARNm (14). A expressão do ARN quimérico é dirigida pelo promotor dependente de polimerase II do gene de ARNnp de U1 que previamente se demonstrou levar a níveis elevados de transcritos (15). É também facilmente possível remover a região do ARNnp de U1 que se liga à proteína de 70 kDa que está envolvida na activação do local de *splicing* a 3' de um intrão a montante e/ou inserir em ambos de U1 e U2 os anti-sentidos duplos da molécula.

O outro tipo de vector de ARN utilizado é o ARNnp de U2. Este ARN está normalmente envolvido na reacção de *splicing* porque reconhece a sequência do local de ramificação intrónica e dirige a entrada, no *spliceossoma*, do ARNnp de U6 catalítico (21,22). Tanto o reconhecimento de ARNnp de U2 para o local de ramificação como a sua interacção com ARNnp de U6 são mediados por interacções de pares de bases. No desenho dos autores, foi primeiro produzido um derivado de U2 (U2mod) com mutações na região de emparelhamento com ARNnp de U6. Fizeram-se substituições de nucleótidos de maneira a que a estrutura secundária do ARNnp de U2 não fosse afectada (Fig. 1B). A ausência de interacção com o ARNnp de U6 deverá assegurar que o ARNnp de U2 modificado não interfira com o aparelho celular de *splicing* e não recrute o *spliceossoma* no intrão com o qual está emparelhado. O U2mod foi subsequentemente modificado de modo a que a região de emparelhamento de locais de ramificação fosse substituída por 28 nucleótidos complementares com o local de ramificação e a região a 3' do intrão 50, dando origem à construção U2-BP (Fig. 1B).

Todas as construções descritas foram clonadas separadamente ou em pares na LTR a 3' (região U3) do vector retroviral pBabe-puro e as partículas virais foram obtidas por transfecção de ADN plasmídicos na linha celular de empacotamento Phoenix (23).

Transdução de construções anti-sentido em células derivadas de DMD e análise da sua expressão

As células de uma biópsia de músculo do paciente de DMD 491A foram colocadas em cultura e imortalizadas por integração mediada por retrovírus de um antigénio T grande de SV40 de tipo selvagem (24). As células imortalizadas foram infectadas com partículas retrovirais recombinantes e seleccionaram-se as integrações estáveis em meio contendo puromicina.

A expressão dos ARN anti-sentido foi controlada por análise de *Northern* na população celular total crescida na presença de puromicina. A Figura 2 mostra que todas as construções expressam os ARN quiméricos em níveis francamente bons.

Experiências de micro-injecção de oócitos de *X. laevis* mostraram que todas as construções acima descritas são expressas em níveis elevados e que todas elas estão especificamente localizadas no compartimento nuclear. Estes resultados demonstram que as modificações introduzidas nos diferentes ARNnp não afectam nem a sua estabilidade global nem a sua localização subcelular.

Sabe-se que a construção U1 não interfere com funções celulares endógenas (30, 31). Para determinar se um excesso da forma modificada de ARNnp de U2 interferiu com a eficiência do mecanismo de *splicing*, acumularam-se os produtos de *splicing* de um pré-ARNm de controlo. O pré-ARNm de AdML marcado com ^{32}P (veja-se a secção de Materiais e Métodos) foi injectado nos núcleos de oócitos de *X. laevis* previamente injectados com o gene de U2h ou U2-BP. O ARNnp de U6 marcado com ^{32}P foi co-injectado como controlo interno. A Figura 3A mostra que não se observa redução na eficiência de *splicing* quando a construção com a molécula de U2 anti-sentido é sobre-expressa nos núcleos em comparação com a sobre-expressão do ARNnp de U2h de tipo selvagem. A análise *Northern blot* foi também realizada com os

oócitos para verificar a expressão dos ADN injectados. O Painel B) mostra a expressão de U2-BP, e o Painel C) a expressão de ARNnp de U2h de controlo. A expressão específica de U2h é revelada pela presença de um pré-ARNnp de U2 que se acumula especificamente nos oócitos (37). Portanto, a sobre-expressão de U2-BP não interfere com a eficiência do mecanismo de *splicing*.

Análise do ARNm produzido em resposta ao tratamento anti-sentido

Populações celulares mistas que expressam diferentes tipos de construções quiméricas simples foram analisadas por RT-PCR quanto à presença ou ausência do exão 51 no ARNm maduro. A Figura 4 mostra a análise em gel dos produtos de RT-PCR obtidos com pares específicos de oligos como especificado no topo de cada painel. Da primeira série de células testadas, apenas U1-5' originou uma banda fraca correspondente à dimensão de um produto em que o exão 51 foi omitido. Se comparado com a quantidade do produto sem omissão, parece que menos de 10% do ARNm foi destituído do exão 51.

Para determinar se a eficiência da correcção aumenta na presença de ARN anti-sentido contra ambas as junções de *splicing*, fez-se uma construção adicional em que pares de construções anti-sentido foram clonadas em tandem no interior do vector retroviral pBabe (Fig.5A). Também neste caso células de DMD imortalizadas foram infectadas com partículas retrovirais recombinantes e seleccionaram-se integrações estáveis em meio contendo puomicina.

A expressão destas construções anti-sentido duplas foi testada *in vivo* por análise de *Northern*. A Fig.5B mostra que a clonagem cabeça-com-cauda não interfere com a expressão eficiente de ambos os ARN quiméricos.

Os mioblastos de DMD portadores das construções anti-sentido duplas foram depois analisados quanto à omissão do exão 51 por RT-PCR. A Figura 5C mostra que a construção 5'/BP produz o surgimento de uma banda correspondente à dimensão de um produto com omissão (217 nucleótidos de comprimento). A análise da sequência da banda purificada em gel indicou que o produto com omissão contém uma fusão exacta do exão 47 com o

exão 52. Estes resultados suportam a hipótese prévia de que ambas as junções de *splicing* deverem estar mascaradas por sequências anti-sentido de modo a haver uma omissão eficiente do exão 51. Na construção 5'/BP, a quantidade de produto com omissão é da ordem de 30-40%.

Recuperação da síntese de distrofina

Células 491A imortalizadas transduzidas com as construções anti-sentido duplas foram analisadas quanto à síntese de distrofina por análise de *Western*. Correram-se 100 microgramas de proteínas totais num gel de poliacrilamida a 6% e, após a transferência ("*blotting*"), fizeram-se reagir com anticorpos específicos para distrofina. Em comparação com DMD não tratadas (pista 491A), as células que expressam as construções anti-sentido apresentam recuperação da síntese de distrofina (Fig. 6). Os níveis de distrofina são francamente bons se comparados com os presentes no controlo de células do músculo-esquelético (pista SMC). A banda de migração mais rápida (indicada por um ponto) deve representar um produto específico da degradação da distrofina. A ausência de diferença de tamanhos observada entre a distrofina normal e a induzida no *Western blot* era esperada, porque a remoção dos exões 48 a 51, que codificam para 210 aminoácidos, não alterariam significativamente a migração de uma proteína tão grande (427 kDa) num gel de poliacrilamida. O painel inferior na Figura 6 mostra um controlo de análise *Western blot* no mesmo gel com anticorpos anti-miosina.

Referências

- 1) Koenig, M., et al. (1989) *Am J Hum Genet.* **45**, 498-506.
- 2) Hodgson, S.V. & Bobrow, M. (1989) *Br Med Bull.* **45**, 719-744.
- 3) Zatz, M., Lange, K. & Spence, M.A. (1977) **1**, 759.
- 4) Gussoni, E., Blau, H.M. & Kunkel, L.M. (1997) *Nat Med.* **3**, 970-977.
- 5) Partridge, T.A., et al. (1989) *Nature* **337**, 176-9
- 6) Wang, B., Li, J. & Xiao, X. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 13714-13719.

- 7) Campeau, P., et al. (2001) *Gene Ther.* **8**, 1387-1394.
- 8) Cho, W.K., et al. (2000) *Hum Gene Ther* **11**, 701-14
- 9) Chen, H.H., et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1645-50
- 10) van Deutekom, J.C., et al. (2001) *Hum Mol Genet.* **10**, 1547-1554.
- 11) Mann, C.J., et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 42-47.
- 12) Dunckley, M. G., et al. (1998) *Hum Mol Genet.* **7**, 1083-1090.
- 13) Wilton, S.D., et al. (1999) *Neuromuscul Disord.* **9**, 330-338.
- 14) Zhuang, Y. & Weiner, A.M. (1986) *Cell.* **46**, 827-835.
- 15) Michienzi, A., Prislei, S. & Bozzoni, I. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 7219-7224.
- 16) Gorman. L., et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 4929-4934.
- 17) Grimm, C., Stefanovic, B. & Schumperli, D. (1993) *EMBO J.*, **12**, 1229-1238.
- 18) Galli, G., et al. (1983) *Cell.* **34**, 823-828.
- 19) Bond, U.M., Yario, T.A. & Steitz, J.A. (1991) *Genes Dev.* **5**, 1709-1722.
- 20) Spycher, C., et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4023-4030.
- 21) Datta, B. & Weiner, A.M. (1991) *Nature* **352**, 821-824.
- 22) Sun, J.S. & Manley, J.L. (1995) *Genes Dev.* **9**, 843-854.
- 23) Morgestem, J.P. & Land, H. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 3587-3596.
- 24) Berghella, L., et al. (1999) *Hum Gene Ther.* **10**, 1607-1617.
- 25) Cech, T.R. (1989) *Biochem Int.* **18**, 7-14.
- 26) Buonomo, S.B., et al. (1999) *RNA* **5**, 993-1002.
- 27) Crooke, S.T. (1998) *Anti-sense Nucleic Acids Drug Dev.* **8**, 133-134.

- 28) Kole, R. & Sazani, P. (2001) *Curr Opin Mol Ther* **3**, 229-234.
- 29) Sierakowska, H., et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 12840-12844.
- 30) Gorman, L., Mercatante, D.R. & Kole, R. (2000) *J Biol Chem* **275**, 35914-35919.
- 31) Michienzi, A., et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**, 8955-8960.
- 32) Suter, D., et al. (1999) *Hum Mol Genet.* **8**, 2415-2423.
- 33) Bertrand, E., et al. (1997) *RNA* **3**, 75-88.
- 34) Sullenger, B.A. & Cech, T.R. (1993) *Science* **262**, 1566-1569.
- 35) Bimstiel, M.L. & Schaufele, F. (1988) em *Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles*, ed. Birnstiel, M.L. (Springer, Berlin), pp. 155-182.
- 36) Baserga, S.J. & Steitz J.A. (1993) em *The RNA world* (Gesteland R.F., e Atkins J.F., eds.), pp. 359-381. Cold Spring Harbor Press, Plainview. NY.
- 37) You, C-H, Ares, M Jr & Weiner, A M (1985) *Cell* **42**, 193-202.
- 38) Fragapane P., et al. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1117-1125.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Università degli Studi di Roma La Sapienza

<120> MOLÉCULAS DE ARNnp QUIMÉRICAS PORTADORAS DE SEQUÊNCIAS ANTI-SENTIDO CONTRA AS JUNÇÕES DE *SPLICING* DO GENE DA DISTROFINA E SUAS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

<130> 30130

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 32
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> anti 24+2A

<400> 1
gtatgagaaa aaatgagatc ttgggcctct gc 32

<210> 2
<211> 33
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> ANTI 24+2B

<400> 2
cttctgcttg atggcagggg agataccatg atc 33

<210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> Ulcas A

<400> 3
cctggtacca tgagatcttg ggcctctgc 29

<210> 4
<211> 27
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> Ulcas B

<400> 4
cctctcgagc tgactttctg gagtttc 27

<210> 5
<211> 35
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> U2mA

<400> 5
aaaggtgtc ttgcgatgcg ctgccttcg cgccc 35

<210> 6
<211> 36
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> U2mB

<400> 6

tggtatctc tcgagtatca gtttaatatc tgatac 36

<210> 7

<211> 41

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> U2X

<400> 7

ctcgagagat agccaaaagg ctgtcttcgc atgcgctcgc c 41

<210> 8

<211> 50

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> U2BP

<400> 8

aaaaagaaga aaaagaaaaa ttagaaacta tcagtttaat atctgatacg 50

<210> 9

<211> 34

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> U2cas up

<400> 9

ctagctagcc aggccttcgg cttcttcgac tggg 34

<210> 10

<211> 34

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> U2cas down

<400> 10

ctagctagcg cgcgtcacag gactcgtgca agcc 34

<210> 11

<211> 24

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> U1a

<400> 11

atcaagcaga aggtatgaga aaaa 24

<210> 12

<211> 23

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> U2a

<400> 12

gtttctaatt tttctttttc ttc 23

<210> 13

<211> 22

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> E46F

<400> 13

gaatttggtt tatggttgga gg 22

<210> 14

<211> 22

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> E54F

<400> 14

cttttatgaa tgcttctcca ag 22

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> E47F

<400> 15

ttactggtgg aagagttgcc 20

<210> 16

<211> 26

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> E52R

<400> 16

ttcgatccgt aatgattggt ctagcc 26

Lisboa, 2010-02-15

reivindicação 4 ou vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, para utilização no tratamento de Distrofia Muscular de Duchenne.

10. Utilização de um gene de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, de um ARNnp de U1 humano modificado de acordo com a reivindicação 4 ou de um vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, no fabrico de um medicamento para utilização no tratamento de Distrofia Muscular de Duchenne.

Lisboa, 2010-02-15

REIVINDICAÇÕES

1. Gene que codifica um ARNnp de U1 humano modificado em que o fragmento do gene de U1 a 5' que transcreve a região de U1 que é de cadeia simples compreende uma sequência anti-sentido complementar às junções de *splicing* a 5' e 3' de pelo menos uma sequência de exão do pré-ARNm da distrofina, de modo a que pelo menos uma sequência de exão do pré-ARNm da distrofina seja omitida durante o processo de *splicing* que converte o pré-ARNm no ARNm maduro.

2. Gene de acordo com a reivindicação 1 em que o ARNnp de U1 humano modificado é adicionalmente modificado de modo a que o fragmento do gene de U1 que transcreve a sequência de ARN que interage com a proteína de 70k associada a U1 seja eliminado.

3. Gene de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que pelo menos o exão 51 do pré-ARNm da distrofina é omitido.

4. ARNnp de U1 humano modificado transcrito pelo gene de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Vector para a expressão estável e eficiente em células-alvo que expressam distrofina que transcrevem o ARNnp de U1 humano modificado de acordo com a reivindicação 4.

6. Vector de acordo com a reivindicação 5 que é um vector retroviral, adenoviral ou viral adeno-associado.

7. Vector de acordo com a reivindicação 5 ou 6 adequado para transferir para células estaminais ou para células de fibra muscular.

8. Gene de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ARNnp de U1 humano modificado de acordo com a reivindicação 4 ou vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, para utilização num método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia.

9. Gene de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ARNnp de U1 humano modificado de acordo com a

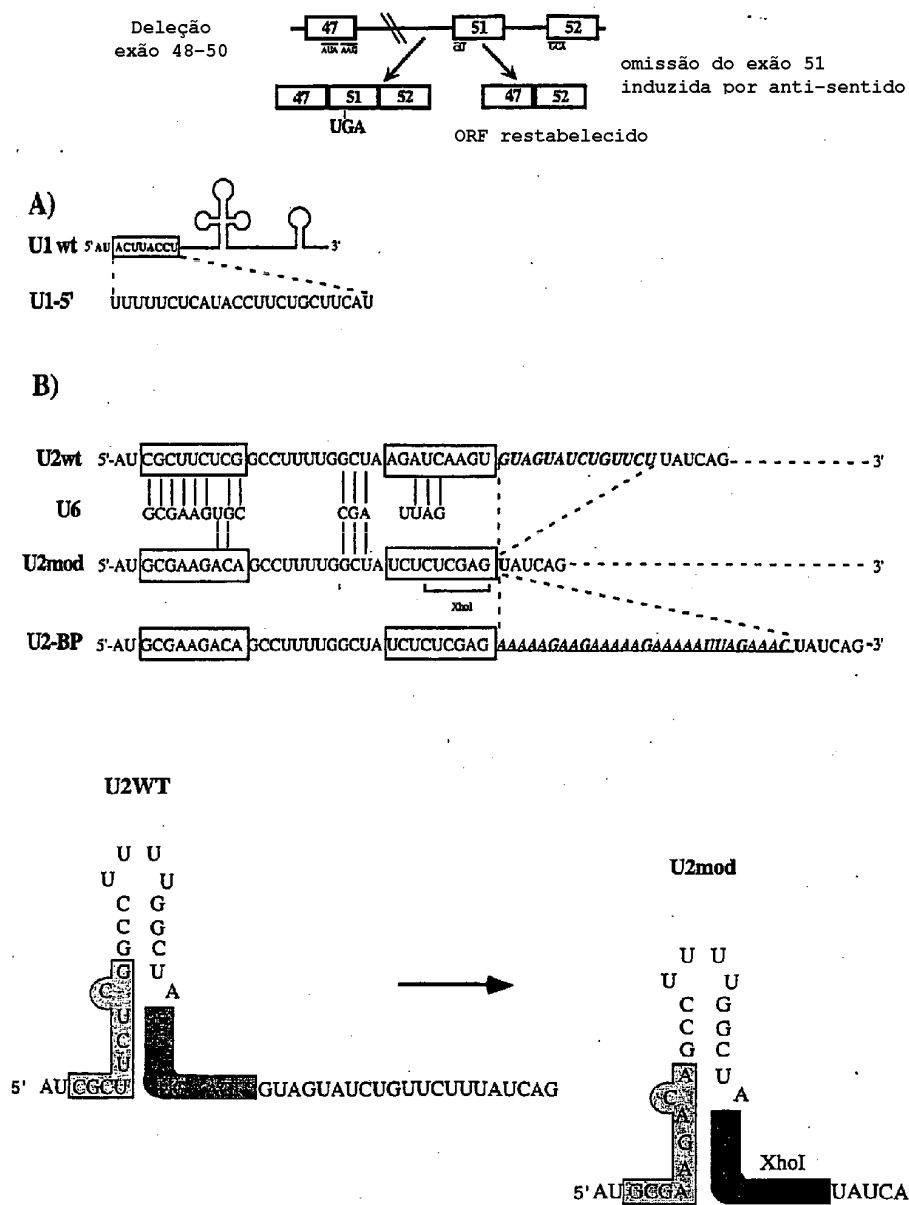
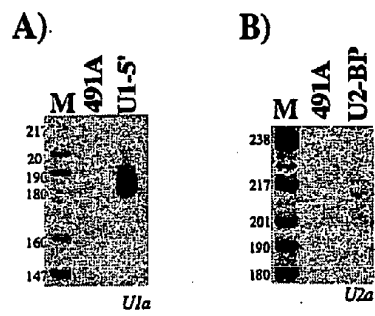
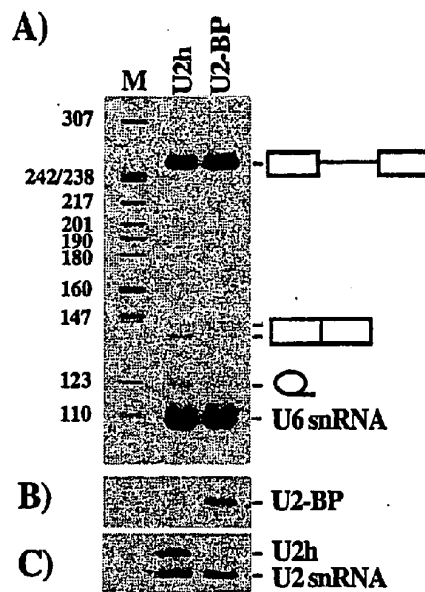


FIG. 1

**FIG. 2****FIG. 3**

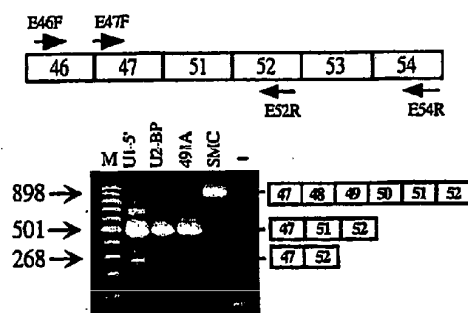


FIG. 4

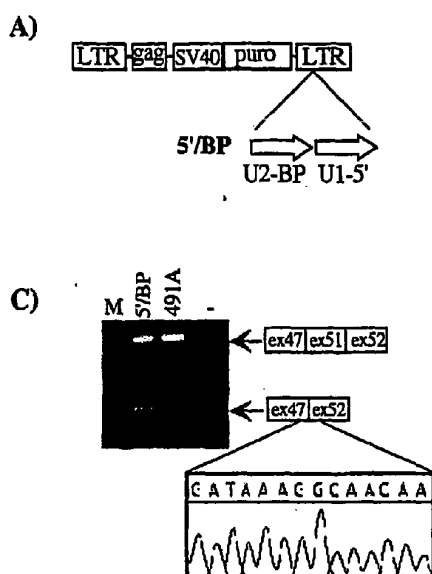


FIG. 5



FIG. 6