

(11) Número de Publicação: **PT 1619249 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/11 (2007.10) **A61K 48/00** (2007.10)
A61K 31/7088 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: 2001.09.21	(73) Titular(es): ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN ALBINUSDREEF 2 NL-2333 ZA LEIDEN NL
(30) Prioridade(s): 2000.09.21 EP 00203283	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.01.25	(72) Inventor(es): GARRIT-JAN BOUDEWIJN VAN OMMEN NL JUDITH CHRISTINA THEODORA VAN DEUTEKOM NL JOHANNES THEODORUS DEN DUNNEN NL
(45) Data e BPI da concessão: 2008.09.24 004/2009	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **INDUÇÃO DO SALTO DE EXÕES EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS**

(57) Resumo:

RESUMO**"INDUÇÃO DO SALTO DE EXÕES EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS"**

O presente invento proporciona um método para, pelo menos em parte, baixar a produção de uma proteína aberrante numa célula, a referida célula compreendendo pré-mRNA consistindo nos exões codificadores da referida proteína através da indução do chamado salto de exões na referida célula. O salto de exões resulta em mRNA maduro que não contem o exão saltado, o que conduz a um produto alterado se o referido exão codificar aminoácidos. O salto de exões é realizado fornecendo a uma célula um agente capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão, por exemplo uma sequência de reconhecimento de exão, do referido exão. O referido sinal de inclusão de exão pode ser intervencionado através de um ácido nucleico tendo complementaridade com uma parte do referido exão. O referido ácido nucleico, que é igualmente proporcionado, pode ser usado para a preparação de um medicamento, por exemplo para o tratamento de uma doença hereditária.

DESCRIÇÃO**"INDUÇÃO DO SALTO DE EXÕES EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS"**

Considerando os avanços rápidos na pesquisa do genoma humano, os profissionais e o público esperam que o futuro próximo traga - para além da compreensão dos mecanismos de doença e diagnósticos sofisticados e credíveis - igualmente terapias para muitas doenças genéticas devastadoras.

Enquanto se espera que para algumas doenças (e.g., metabólicas) os novos conhecimentos originem terapias com moléculas pequenas, facilmente administráveis, é provável que, na maior parte dos casos, seja necessária uma ou outra forma de terapia génica, i.e. a correcção, adição ou substituição do produto do gene defectivo.

Nos últimos anos, a pesquisa e o desenvolvimento nesta área puseram em evidência várias dificuldades técnicas que têm de ser ultrapassadas, e.g., relacionadas com o tamanho grande de muitos genes envolvidos na doença genética (limitando a escolha de sistemas adequados para administrar o gene terapêutico), a acessibilidade do tecido em que o gene terapêutico deverá funcionar (requerendo o desenho de técnicas de direcção específicas, fisicamente através de injeção localizada ou biológica-

mente através do desenvolvimento de sistemas com afinidades específicas de tecido) e a segurança do sistema de administração para o doente. Estes problemas estão, até certo ponto, correlacionados e pode-se concluir de um modo geral que quanto mais pequeno for o agente terapêutico, mais fácil se tornará desenvolver sistemas de administração eficientes, direccionáveis e seguros.

O presente invento aborda este problema ao induzir nas células o chamado salto de exões. O salto de exões resulta em mRNA maduro que não possui o exão saltado e, assim, quando o referido exão codifica aminoácidos pode conduzir à expressão de um produto alterado. A tecnologia para o salto de exões é normalmente dirigida para a utilização dos chamados "oligonucleótidos complementares da cadeia codificadora" ("Anti-sense Oligonucleotides", "AONs"). Muito deste trabalho é realizado no modelo de ratinho mdx da distrofia muscular de Duchenne (DMD). O ratinho mdx, que é portador de uma mutação sem sentido no exão 23 do gene da distrofia, tem sido usado como modelo animal da distrofia muscular de Duchenne. Apesar da mutação mdx, que deverá impedir a síntese de uma proteína distrofina funcional, têm sido observadas raras fibras naturais positivas para distrofina em tecido de músculo mdx. Pensa-se que estas fibras positivas para distrofina tenham surgido de um mecanismo de salto de exões, aparentemente natural, devido a mutações somáticas ou através de "splicing" alternativo. AONs dirigidos, respectivamente para os locais de "splicing" 3' e 5' dos

intrões 22 e 23 no pré-mRNA da distrofina, interferem com factores normalmente envolvidos na remoção do intrão 23, de forma que também o exão 23 é removido do mRNA (Wilton, 1999). Num estudo semelhante, Dunckley *et al.*, (1998) mostraram que o salto de exões usando AONs dirigidos contra os locais de "splicing" 3' e 5' pode ter resultados inesperados. Eles observaram que o salto não só do exão 23 como também dos exões 24-29 resulta num mRNA contendo a junção do exão 23 com o exão 30. Desconhece-se o mecanismo subjacente ao aparecimento da variante inesperada de "splicing" 22-30. Poderá ser devido ao facto de os locais de "splicing" possuírem sequências de consenso que conduzem à hibridação promíscua dos oligos usados para dirigir o salto de exões. A hibridação dos oligos com outros locais de "splicing", para além dos locais do exão a ser saltado, poderá facilmente interferir com a precisão do processo de "splicing". Por outro lado, a precisão poderá não existir devido ao facto de ser necessário usar dois oligos (para o local de "splicing" 5' e 3'). O pré-mRNA contendo um mas não o outro oligo poderá ser susceptível a variantes de "splicing" inesperadas. Para ultrapassar estes e outros problemas, o presente invento proporciona um método para direccionar o "splicing" de um pré-mRNA num sistema capaz de realizar uma operação de "splicing" compreendendo o contacto do referido pré-mRNA no referido sistema com um agente capaz de inibir especificamente um sinal de inclusão de exão de pelo menos um exão no referido pré-mRNA, o referido método ainda compreende "splicing" do referido pré-mRNA. A interferência com um sinal de inclusão de exão

("EIS") tem a vantagem de tais elementos estarem situados dentro do exão. Ao proporcionar um oligo complementar da cadeia codificadora no interior do exão a ser saltado, é possível interferir com o sinal de inclusão do exão ocultando eficazmente o exão em relação ao aparelho de "splicing". A incapacidade do aparelho de "splicing" de reconhecer o exão a ser saltado conduz assim à exclusão do exão do mRNA final. O presente invento não interfere directamente com o processo enzimático da maquinaria de "splicing" (a junção dos exões). Pensa-se que isto permite que o método seja mais robusto e reproduzível. Pensa-se que um EIS seja uma estrutura particular de um exão, que permite que o aceitador e o dador de "splicing" assumam uma conformação espacial particular. Neste conceito é a conformação espacial particular que permite à maquinaria de "splicing" reconhecer o exão. No entanto, o invento não está certamente limitado a este modelo. Encontrou-se que agentes capazes de se ligarem a um exão podem inibir um EIS. Os agentes podem especificamente contactar com o referido exão em qualquer ponto e ainda serem capazes de especificamente inibir o referido EIS. O referido mRNA pode ser útil por si só. Por exemplo, a produção de uma proteína indesejável pode ser, pelo menos em parte, reduzida através da inibição da inclusão de um exão necessário no mRNA. De preferência, um método do invento ainda compreende a tradução do mRNA produzido a partir do "splicing" do referido pré-mRNA. De preferência, o referido mRNA codifica uma proteína funcional. Numa realização preferida a referida proteína compreende dois ou mais domínios, em que

pelo menos um dos referidos domínios é codificado pelo referido mRNA como resultado do salto de pelo menos parte de um exão no referido pré-mRNA. O salto de exões, tipicamente, não sendo necessariamente importante para proteínas na configuração selvagem, possui pelo menos dois domínios funcionais que desempenham uma função, em que os referidos domínios são gerados a partir de partes distintas da sequência de aminoácidos primária. Um exemplo pode ser factores de transcrição. Tipicamente, estes factores compreendem um domínio de ligação a DNA e um domínio que interage com outras proteínas na célula. O salto de um exão que codifica uma parte da sequência de aminoácidos primária situada entre estes dois domínios pode conduzir a uma proteína mais curta que possui a mesma função, pelo menos em parte. Assim, as mutações prejudiciais nesta região intermédia (por exemplo mutações de mudança de grelha de leitura ou de paragem) podem ser, em parte, reparadas através da indução do salto de exões para permitir a síntese de uma proteína funcional (parcialmente) mais curta. Usando um método do invento é igualmente possível induzir o salto parcial do exão. Nesta realização, o referido contacto resulta na activação de um local de "splicing" críptico no exão contactado. Esta realização alarga o potencial da manipulação do pré-mRNA conduzindo a uma proteína funcional. De preferência, o referido sistema compreende uma célula. De preferência, a referida célula é cultivada *in vitro* ou no organismo *in vivo*, tipicamente, ainda que não necessariamente, o referido organismo compreende um ser humano ou um ratinho.

Pode ser usado qualquer agente capaz de especificamente inibir um sinal de exclusão de exão do presente invento. De preferência, o referido agente compreende ácido nucleico ou um seu equivalente funcional. De preferência, mas não necessariamente, o referido ácido nucleico tem a forma de cadeia simples. Ácido nucleico peptídico e outras moléculas compreendendo as mesmas características do tipo de ligação do ácido nucleico, não necessariamente da quantidade, são equivalentes adequados. O ácido nucleico ou um equivalente pode compreender modificações para proporcionar uma funcionalidade adicional. Por exemplo, pode ser usado 2'-O-metil-oligo-ribonucleótidos. Estes ribonucleótidos são mais resistentes à acção de RNases do que os oligonucleótidos convencionais.

Numa realização preferida do invento, o referido sinal de inclusão de exão sofre interferência por um ácido nucleico complementar da cadeia codificadora dirigido contra uma sequência de reconhecimento de exão ("ERS"). Estas sequências são relativamente ricas em purinas e podem ser distinguidas analisando a informação da sequência do exão a ser saltado (Tanaka *et al.*, 1994 *Mol Cell Biol.* 14: p. 1347-1354). Pensa-se que as sequências de reconhecimento de exão ajudem à inclusão no mRNA dos chamados exões fracos (Achsel *et al.*, 1996; *J. Biochem.* 12; p 53-60). Estes exões fracos compreendem, por exemplo, locais de "splicing" 5' e 3' que são menos eficazmente reconhecidos pela maquinaria de "splicing". No presente invento, encontrou-se que o

salto de exões pode também ser induzido nos chamados exões fortes, *i.e.* exões que normalmente são eficazmente reconhecidos pela maquinaria de "splicing" da célula. A partir de qualquer sequência determinada é (quase) sempre possível prever se a sequência compreende exões putativos e determinar se estes exões são fortes ou fracos. Existem vários algoritmos para determinação da força de um exão. Um algoritmo útil pode ser encontrado no servidor NetGene2 que prevê locais de "splicing" (Brunak, *et al.*, 1991; J. Mol. Biol. 220: p. 49-65). O salto de exões de acordo com o invento pode ser induzido em (quase) todos os exões, independentemente do referido exão ser um exão fraco ou exão forte e também independentemente do referido exão compreender uma ERS. Numa realização preferida, um exão que se pretende saltar é um exão forte. Numa outra realização preferida, um exão que se pretende saltar não compreende uma ERS.

Os métodos do invento podem ser usados de muitas formas. Numa realização, um método do invento é usado para, pelo menos em parte, baixar a produção de uma proteína aberrante. Tais proteínas podem, por exemplo, ser oncoproteínas ou proteínas virais. Em muitos tumores, não só a presença de uma oncoproteína, como também o seu nível relativo de expressão foram associados ao fenótipo da célula tumoral. De forma semelhante, não só a presença das proteínas virais, como também a quantidade de proteína viral numa célula determina a virulência de um vírus particular. Ainda, para a multiplicação eficiente e

disseminação de um vírus, a altura da expressão no ciclo replicativo e o equilíbrio na quantidade de determinadas proteínas virais numa célula determinam se os vírus são eficazmente ou ineficazmente produzidos. Usando um método do invento é possível baixar a quantidade de proteína aberrante numa célula, de forma que, por exemplo, uma célula tumoral se torne menos tumorigénica (metastática) e/ou uma célula infectada por um vírus produza menos vírus.

Numa realização preferida, um método do invento é usado para modificar a referida proteína aberrante numa proteína funcional. Numa realização a referida proteína funcional é capaz de realizar uma função de uma proteína normalmente presente numa célula mas ausente nas células a serem tratadas. Muito frequentemente, mesmo a restauração parcial da função resulta na melhoria significativa do desempenho da célula tratada. Devido a um melhor desempenho, tais células podem também ter uma vantagem selectiva relativamente às células não modificadas, ajudando assim à eficácia do tratamento.

Este aspecto do invento é particularmente adequado para a restauração da expressão dos genes defectivos. Isto é conseguido através do salto específico dos exões pretendidos, ultrapassando ou corrigindo assim mutações prejudiciais (tipicamente mutações de codões de paragem ou mutações pontuais de mudança de grelha de leitura, deleções ou inserções de um ou vários exões, conduzindo à terminação da tradução).

Comparativamente com as estratégias de introdução de genes, a nova forma da terapia génica com modulação de "splicing" requer a administração de reagentes terapêuticos muito mais pequenos, tipicamente, 14 e 40 nucleótidos, mas não lhe estando limitados. Numa realização preferida, são usadas moléculas de 14-25 nucleótidos uma vez que estas moléculas são mais fáceis de produzir e entram na célula mais eficazmente. Os métodos do invento permitem muito maior flexibilidade no desenho subsequente de sistemas de administração eficazes e seguros. Uma vantagem adicional importante deste aspecto do invento é que restaura (pelo menos alguma) actividade do gene endógeno, o qual ainda possui a maior parte ou a totalidade do seu circuito regulador de genes, assegurando assim os níveis de expressão correctos e a síntese de isoformas específicas de tecido.

Este aspecto do invento pode, em princípio, ser aplicado a qualquer doença genética ou predisposição genética para doença, em que o salto pretendido de exões específicos restaurará a grelha de leitura de tradução quando esta for interrompida pela mutação original, desde que a tradução de uma proteína ligeiramente mais curta internamente ainda seja total ou parcialmente funcional. As realizações preferidas para as quais este pedido pode ter valor terapêutico são: predisposição para segundas mutações em genes supressores de tumores, e.g., as envolvidas em cancro da mama, cancro do cólon, esclerose tuberosa,

neurofibromatosa, etc., - em que a restauração (parcial) da actividade impedirá a manifestação de nulossomia pelo segundo lote de mutações e assim protegerá contra a tumorigénese. Uma outra realização preferida envolve a restauração (parcial) de produtos de genes defectivos que tenham um efeito directo na doença, e.g., hemofilia A (deficiência no factor de coagulação VIII), algumas formas de hipotiroidismo congénito (devido a deficiência na síntese de tiroglobulina) e distrofia muscular de Duchenne (DMD), em que as deleções de mudança de grelha de leitura, duplicações e mutações de codões de paragem no gene da distrofina ligada a X causam degradação progressiva, grave, do músculo. DMD é tipicamente letal na fase tardia da adolescência ou no início da idade adulta, enquanto que as deleções ou duplicações no mesmo gene causa a distrofia muscular de Becker (BMD) muito mais suave, compatível com uma esperança de vida entre 35-40 anos até à normal. Na realização, como aplicado a DMD, o presente invento permite que o salto de exões prolongue uma deleção existente (ou altere o produto mRNA de uma duplicação existente), em tantos exões adjacentes quanto os necessários para restaurar a grelha de leitura, e origine uma proteína internamente ligeiramente encurtada, mas ainda funcional. Com base nos sintomas clínicos muito mais suaves dos doentes BMD com o equivalente desta deleção induzida, a doença nos doentes DMD terá um curso muito mais suave após terapia com AON.

Muitas mutações diferentes no gene da distrofina

podem conduzir a uma proteína disfuncional. (Para uma lista abrangente ver <http://www.dmd.nl>, a base de dados internacionalmente aceita para DMD e alterações relacionadas.) O exão precisa ser saltado, para gerar uma proteína distrofina funcional, varia de mutação para mutação. A Tabela 1 compreende uma lista não limitante de exões que podem ser saltados e apresenta para os referidos exões algumas das mutações mais frequentes no gene da distrofina que foram observados em seres humanos e que podem ser tratados com um método do invento. O salto do exão atrás referido conduz a uma proteína distrofina mutante, compreendendo pelo menos a funcionalidade de um mutante Becker. Assim, numa realização, o invento proporciona um método do invento em que o referido sinal de inclusão de exão está presente nos exões números 2, 8, 19, 29, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52 ou 53 do gene da distrofina humana. A ocorrência de determinadas variações de deleções/inserções é mais frequente do que outras. No presente invento foi encontrado que através da indução do salto do exão 46 como um meio ou um método do invento, aproximadamente 7% dos doentes contendo a deleção DMD podem ser tratados, resultando nos referidos doentes possuírem fibras musculares positivas para a distrofina. Através da indução do salto do exão 51, aproximadamente 15% dos doentes contendo a deleção DMD podem ser tratados com um meio ou método do invento. Tal tratamento resultará no doente possuir pelo menos algumas fibras positivas para a distrofina. Assim, com o salto do exão 46 ou 51, usando um método do invento, aproximadamente 22% dos doentes contendo

uma deleção no gene da distrofina podem ser tratados. Assim numa realização preferida do invento, o referido sinal de exclusão de exão está presente no exão 46 ou no exão 51. Numa realização particular preferida, o referido agente compreende uma sequência de ácido nucleico de acordo com hAON#4, hAON#6, hAON8, hAON#9, hAN#11 e/ou um ou mais de hAON#21-30 ou uma parte funcional, derivado e/ou análogo do referido hAON#. Uma parte funcional, derivado e/ou análogo do referido hAON# compreende o mesmo tipo de actividade de salto de exão, num método do invento, não necessariamente a mesma quantidade.

Pode ser vantajoso induzir o salto de exão de mais de um exão no pré-mRNA. Por exemplo, considerando uma larga variedade de mutações e a natureza fixa dos comprimentos dos exões e sequências de aminoácidos flanqueantes de tais mutações, pode ocorrer a situação de ser necessário saltar mais de um exão para ser restaurada a função. Um exemplo preferido, mas não limitante, de tal caso na base de dados de deleções DMD é a deleção 46-50. os doentes compreendendo uma deleção 46-50 não produzem distrofina funcional. No entanto, distrofina pelo menos parcialmente funcional pode ser gerada através da indução do salto do exão 45 e do exão 51. Um outro exemplo preferido mas não limitante é os doentes compreendendo uma duplicação do exão 2. Através do fornecimento de um agente capaz de inibir um EIS do exão 2, é possível saltar parcialmente um ou ambos os exões, dando assim origem à proteína selvagem, a seguir à truncada ou à proteína com

duplo salto de exões. Um outro exemplo preferido, mas não limitante, é o salto dos exões 45 a 50. Isto gera uma variante do tipo Becker em grelha. Esta variante tipo Becker pode ser gerada para curar qualquer mutação localizada nos exões 45, 46, 47, 48, 49 e/ou 50 ou combinação das mesmas. Num aspecto, o invento proporciona um método do invento compreendendo o fornecimento à referida célula de um novo agente capaz de inibir um sinal de inclusão de exão num outro exão do referido pré-mRNA. Certamente está totalmente dentro do âmbito do invento usar dois ou mais agentes para a indução de salto de exão no pré-mRNA de dois ou mais genes diferentes.

Num outro aspecto, o invento proporciona um método para a selecção de agentes adequados para a terapia de "splicing" e a sua validação como agentes específicos de salto de exões em experiências piloto. É proporcionado um método para determinar se um agente é capaz de inibir especificamente um sinal de inclusão de um exão, compreendendo o fornecimento do referido agente à célula tendo um pré-mRNA contendo o referido exão, cultura da referida célula para permitir a formação de um mRNA a partir do referido pré-mRNA e determinação da ausência do referido exão no referido mRNA. Numa realização preferida, o referido agente compreende ácido nucleico ou seu equivalente funcional, o referido ácido nucleico compreendendo complementaridade com uma parte do referido exão. Agentes capazes de induzir o salto específico de exões podem ser identificados com um método do invento. É

possível incluir um rastreamento prévio de agentes através da identificação prévia da capacidade do referido agente para se ligar, com uma afinidade relativamente elevada, ao exão contendo ácido nucleico, de preferência RNA. Para este fim, é proporcionado um método para determinar se um agente é capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão, compreendendo ainda a determinação prévia, *in vitro*, da afinidade de ligação relativa do referido ácido nucleico, ou seu equivalente funcional, para uma molécula de RNA compreendendo o referido exão.

Ainda num outro aspecto, é proporcionado um agente que é obtido através de um método do invento. Numa realização preferida o referido agente compreende ácido nucleico ou um seu equivalente funcional. De preferência, o referido agente, quando usado para induzir o salto de exão numa célula, é capaz de, pelo menos em parte, reduzir a quantidade de proteína aberrante na referida célula. Mais de preferência, o referido salto de exão resulta num mRNA codificador de uma proteína que é capaz de realizar uma função na referida célula. Numa realização particularmente preferida, o referido pré-mRNA deriva de um gene da distrofina. De preferência, a referida proteína funcional compreende pelo menos a funcionalidade de uma proteína distrofina de um doente Becker. Numa realização particularmente preferida o referido agente compreende a sequência de ácido nucleico de hAON#4, hAON#6, hAON8, hAON#9, hAN#11 e/ou um ou mais de hAON#21-30 ou uma parte funcional, derivado e/ou análogo do referido hAON#. Uma

parte funcional, derivado e/ou análogo do referido hAON# compreende o mesmo tipo de actividade de salto de exão, num método do invento, não necessariamente a mesma quantidade.

Estão descritas muitas formas de fornecer agentes às células. Particularmente, foram largamente desenvolvidos os métodos de fornecimento de ácido nucleico. Os familiarizados com a matéria sabem como determinar se um método de fornecimento é adequado para a realização do presente invento. Num exemplo não limitante, o referido método inclui a incorporação de um agente do invento em lipossomas, os referidos lipossomas sendo adicionados às células possuidoras de um pré-mRNA alvo. Os lipossomas são particularmente adequados para a introdução de ácidos nucleicos em células. Moléculas complementares da cadeia codificadora, capazes de induzir o salto de exões, podem ser produzidas numa célula, quando da introdução de ácido nucleico contendo uma unidade de transcrição, para produzir um RNA complementar da cadeia codificadora. São exemplos não limitantes de unidades de transcrição adequadas pequenos RNAs nucleares (SNRP) ou unidades de transcrição de tRNA. O invento ainda proporciona um veículo de entrega de ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico ou seu equivalente funcional do invento capaz de inibir um sinal de inclusão de exão. Numa realização o referido veículo de administração é capaz de expressar o referido ácido nucleico do invento. Certamente, no caso, por exemplo, de serem usados como veículos vírus de cadeia simples, está totalmente dentro do âmbito do invento quando tal vírus

compreende apenas sequência complementar da cadeia codificadora de um agente do invento. Numa outra realização de vírus de cadeia simples, os AONs do invento são codificados por unidades de transcrição de pequenos RNAs nucleares ou de tRNA em ácido nucleico viral encapsidado pelo vírus veículo. Um vírus de cadeia simples preferido é o vírus adeno-associado.

Ainda numa outra realização, o invento proporciona a utilização de um ácido nucleico ou veículo de entrega de ácido nucleico do invento para a preparação de um medicamento. Numa realização preferida, o referido medicamento é usado para o tratamento de uma doença hereditária. Mais de preferência, o referido medicamento é usado para o tratamento de Distrofia muscular de Duchenne.

O invento proporciona um método para dirigir "splicing" de um pré-mRNA, num sistema capaz de efectuar uma operação de "splicing", compreendendo o contacto do referido pré-mRNA no referido sistema com um agente capaz de inibir especificamente um sinal de inclusão de exão de pelo menos um exão no referido pré-mRNA, o referido método ainda compreende "splicing" do referido pré-mRNA. De preferência, o referido método ainda compreende a tradução de mRNA produzido a partir de "splicing" do referido pré-mRNA. De preferência o referido mRNA codifica uma proteína funcional. A referida proteína, de preferência, compreende dois ou mais domínios, em que pelo menos um dos referidos domínios é codificado pelo referido mRNA como resultado do

salto de pelo menos parte de um exão no referido pré-mRNA. De preferência, o referido contacto resulta na activação de um local de "splicing" críptico num exão contactado.

O invento proporciona um método para, pelo menos em parte, baixar a produção de uma proteína aberrante numa célula, a referida célula compreendendo pré-mRNA possuindo exões codificadores da referida proteína, o método compreendendo o fornecimento à referida célula de um agente capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão de pelo menos um dos referidos exões, o método ainda compreendendo a tradução do mRNA produzido a partir do "splicing" do referido pré-mRNA.

O invento ainda proporciona um método do invento em que o referido sinal de inclusão de exão está presente num exão compreendendo um par dador/aceitador de "splicing" forte. De preferência, a referida tradução resulta numa proteína distrofina mutante ou normal, de preferência, em que a referida proteína distrofina mutante é equivalente a uma proteína distrofina de um doente Becker. O referido sinal de inclusão de exão está, de preferência, presente no exão número 2, 8, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52 ou 53.

Um agente no presente invento, de preferência, compreende um ácido nucleico ou um seu equivalente funcional. De preferência, o referido ácido nucleico contém entre 15 e 25 nucleótidos ou um seu equivalente funcional.

Um método do invento, de preferência, ainda compreende o fornecimento à referida célula de um outro agente capaz de inibir um sinal de inclusão de exão presente num outro exão do referido pré-mRNA.

O invento proporciona um método para determinar se um ácido nucleico, ou seu equivalente funcional compreendendo complementaridade com uma parte de um exão, é capaz de inibir especificamente um sinal de inclusão de exão do referido exão, compreendendo o fornecimento do referido ácido nucleico à célula tendo um pré-mRNA contendo o referido exão, cultura da referida célula para permitir a formação de um mRNA a partir do referido pré-mRNA e determinar se o referido exão está ausente do referido mRNA. De preferência, o referido método ainda compreende a determinação *in vitro* da afinidade de ligação relativa do referido ácido nucleico, ou seu equivalente funcional, para uma molécula de RNA compreendendo o referido exão.

O invento proporciona um ácido nucleico ou seu equivalente funcional obtido por um método do invento para determinar se um ácido nucleico, ou seu equivalente funcional compreendendo complementaridade com uma parte de um exão, é capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão do referido exão. O invento proporciona um veículo de administração de ácido nucleico compreendendo o referido ácido nucleico atrás mencionado ou o seu complemento. O invento proporciona um veículo de entrega de ácido nucleico, capaz de expressar um ácido nucleico obtido

por um método do invento, para determinar se um ácido nucleico, ou seu equivalente funcional compreendendo complementaridade com uma parte de um exão, é capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão do referido exão.

O invento proporciona uma utilização de um ácido nucleico obtido por um método do invento para determinar se um ácido nucleico, ou seu equivalente funcional compreendendo complementaridade com uma parte de um exão, é capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão do referido exão ou um veículo de administração de ácido nucleico do invento, para a preparação de um medicamento.

O invento proporciona uma utilização de um ácido nucleico obtido através de um método do invento para determinar se um ácido nucleico, ou seu equivalente funcional compreendendo complementaridade com uma parte do exão, é capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão do referido exão ou veículo de entrega de ácido nucleico do invento, para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença hereditária ou predisposição para uma doença.

O invento proporciona uma utilização de um ácido nucleico, ou de um seu equivalente, compreendendo actividade inibidora de um sinal de inclusão de exão para a preparação de um medicamento.

O invento fornece a um animal, não humano, um ácido nucleico obtido por um método do invento para determinar se um ácido nucleico, ou seu equivalente funcional compreendendo complementaridade com uma parte de um exão, é capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão do referido exão. De preferência, o referido animal não humano ainda compreende um ácido nucleico codificador de uma proteína humana ou um seu equivalente funcional. De preferência, o referido animal não humano ainda compreende uma mutação silenciadora no gene codificador de um homólogo animal da referida proteína humana.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1. A deleção do exão 45 é uma das mutações DMD mais frequentes. Devido a esta deleção, o exão 44 é ligado ao exão 46, a grelha de leitura da tradução é interrompida e um codão de paragem é criado no exão 46 conduzindo a uma deficiência em distrofina. O nosso objectivo é induzir artificialmente o salto de mais um exão, o exão 46, de forma a restabelecer a grelha de leitura e restaurar a síntese de uma proteína distrofina ligeiramente mais curta mas funcional, conforme encontrada nos doentes com distrofia muscular de Becker muito menos afectados, possuidores de uma deleção dos exões 45 e 46.

Figura 2. O exão 46 possui uma região rica em

purinas que se pensa possuir um papel potencial na regulação do seu "splicing" no pré-mRNA. Uma série de oligonucleótidos 2'O-metil-fosforotioato complementares da sequência codificadora (AONs) sobreponíveis foi projectada para ser dirigida contra esta região rica em purinas no exão 46 da distrofina de ratinho. Os AONs diferem tanto em comprimento como em sequência. As modificações químicas tornam os AONs resistentes às endonucleases e à RNaseH nas células do músculo. Para determinar a eficiência de transfecção nos nossos estudos *in vitro*, os AONs continham um grupo 5'fluoresceína que permitiu a identificação de células positivas para AON.

Figura 3. Para determinar a afinidade de ligação dos diferentes AONs para o RNA do exão alvo 46, realizámos ensaios de alteração da mobilidade em gel. Nesta figura, são apresentados os cinco mAONs (mAON#4, 6, 8, 9 e 11) com maior afinidade para o RNA alvo. Quando da ligação dos AONs ao RNA, forma-se um complexo que apresenta uma mobilidade retardada em gel, como pode ser determinado pelo ensaio da alteração da mobilidade de bandas. A ligação dos AONs ao alvo foi específica de sequência. Um mAON ao acaso, *i.e.*, não específico do exão 46, não gerou uma alteração da mobilidade de bandas.

Figura 4. Os AONs específicos de ratinho e de ser humano que apresentam afinidade de ligação mais elevada nos ensaios de alteração de mobilidade em gel foram usados para transfectar culturas de miotubos de ratinho e humanos. (A)

A análise por RT-PCR mostrou um produto truncado, cujo tamanho correspondeu ao exão 45 directamente ligado ao exão 47, nas culturas de células de ratinho quando da transfecção com diferentes mAONs#4, 6, 9 e 11. Não se detectou salto do exão 46 após transfecção com um AON ao acaso. (B) A análise por RT-PCR em culturas de células de músculo humano derivado de um indivíduo não afectado (C) e de dois doentes DMD não relacionados (P1 e P2) revelou produtos truncados quando da transfecção com hAON#4 e hAON#8. No controlo, este produto correspondeu ao exão 45 ligado ao exão 47, enquanto que nos doentes o tamanho do fragmento correspondeu ao exão 44 ligado ao exão 47. Não foi detectado salto do exão 46 nas culturas de células não transfectadas ou após transfecção com um hAON ao acaso. As eficiências mais elevadas de salto do exão 46 foram obtidas com hAON#8.

Figura 5. Dados de sequências dos produtos de RT-PCR obtidos a partir do doente DL279.1 (correspondendo a P1 na Figura 4), que confirmaram a deleção do exão 45 neste doente (painel superior) e o salto adicional do exão 46 após transfecção com hAON#8 (painel inferior). O salto do exão 46 foi específico e o exão 44 foi exactamente ligado ao exão 47 que restabelece a grelha de leitura da tradução.

Figura 6. Análise imuno-histoquímica da cultura de células do músculo do doente DL279.1 quando da transfecção com hAON#8. As células foram expostas a dois anticorpos diferentes contra a distrofina, induzidos contra

regiões diferentes da proteína situadas numa região proximal (ManDys-1, ex.-31-32) e distal (Dys-2, ex.77-79) relativamente ao exão alvo 46. O painel inferior mostra a ausência de uma proteína distrofina nos miotubos, enquanto que o salto induzido por hAON#8 do exão 46 claramente restaura a síntese de uma proteína distrofina conforme detectado por ambos os anticorpos (painel superior).

Figura 7. (A) A análise por RT-PCR de RNA isolado a partir de culturas de células de músculo controlo humano tratadas com hAON#23, #24, #27, #28 ou #29. Um produto truncado, com um tamanho correspondente ao exão 50 a 52 foi detectado nas células tratadas com hAON#23 e #28. A análise da sequência destes produtos confirmou o salto preciso do exão 51 (B). Um outro produto de "splicing" aberrante foi obtido nas células tratadas com hAON#28 e #29. A análise de sequências revelou a utilização de um local de "splicing" críptico em grelha, dentro do exão 51, que é usado numa frequência baixa quando do tratamento com AON. O produto gerado, incluiu um exão 51 parcial que também tinha uma grelha de leitura restaurada, confirmando assim o seu valor terapêutico.

Figura 8. (A) Os ensaios de alteração da mobilidade em gel foram realizados para determinar a afinidade de ligação dos diferentes h29AON#s ao RNA alvo do exão 29. Quando comparado com RNA não hibridado (nenhum), h29AON#1, #2, #4, #6, #9, #10 e #11 geraram complexos com mobilidades em gel mais baixas, indicando a sua ligação ao

RNA. Um AON ao acaso, derivado do exão 19 da distrofina não gerou um complexo. (B) A análise por RT-PCR de RNA isolado a partir de culturas de células de músculo humano controle tratadas com h29AON#1, #2, #4, #6, #9, #10 ou #11 revelou um produto truncado do qual o tamanho correspondeu ao exão 28 ligado ao exão 30. Estes resultados indicam que o exão pode especificamente ser saltado usando AONs dirigidos contra sequências dentro (h29AON#1, #2, #4 ou #6) ou fora (h29AON#9, #10 ou #11), os prováveis ERS no exão 29. Foi observado um outro produto de "splicing" aberrante, o qual resulta do salto dos exões 28 e 29 (confirmado por sequenciação, dados não apresentados). Se bem que este produto esteja presente em células não tratadas, sugerindo que este salto alternativo possa ocorrer naturalmente, foi estimulado pelo tratamento com AON. AON 19, derivado do exão 19 da distrofina, não incluiu o salto do exão 29. (C) O salto específico do exão 29 foi confirmado pelos dados de sequenciação dos fragmentos de RT-PCR truncados. É aqui apresentada a sequência obtida a partir do produto do salto do exão 29 em células tratadas com h29AON#1.

Figura 9. A análise por RT-PCR do RNA isolado a partir de músculos gastrocnémios de ratinho, dois dias após injeção de 5, 10 ou 20 µg de mAON#4, #6 ou #11. Os produtos truncados, com um tamanho correspondendo ao exão 45 ligado ao exão 47, foram detectados em todos os músculos tratados. As amostras -RT, -RNA, AD-1 e AD-2 foram analisadas como controlos negativos para as reacções de RT-PCR. (B) A análise das sequências dos produtos truncados

gerados por mAON#4 e #6 (e #11, não apresentado) confirmou o salto preciso do exão 46.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Uma vez que o exão 45 é um dos exões mais frequentemente deletados em DMD, inicialmente tivemos como objectivo a indução específica do salto do exão 46 (Fig. 1). Isto produzirá a distrofina mais curta funcional, encontrada em doentes BMD portadores de uma deleção dos exões 45 e 46. O sistema foi inicialmente estabelecido para modulação do "splicing" do pré-mRNA da distrofina do gene da distrofina de ratinho. Mais tarde, tivemos como alvo o gene da distrofina humana, com o objectivo de restaurar a grelha de leitura da tradução e a síntese de distrofina em células de músculo de doentes DMD afectados por uma deleção do exão 45.

Projectão de mAONs e hAONs

Projectámos uma série de AONs específicos de ratinho e do ser humano (mAONs e hAONs) dirigidos contra uma parte interna do exão 46 que possui um segmento de sequências ricas em purinas e colocou-se a hipótese de ter um papel regulador putativo no processo de "splicing" do exão 46 (Fig. 2). Para o teste inicial dos AONs nos ensaios

de alteração da mobilidade em gel (ver abaixo), usámos oligonucleótidos de DNA não modificados (sintetizados pela EuroGentec, Bélgica). Para as experiências de transfecção em células de músculo, usámos oligo-ribonucleótidos 2'-O-metilfosforotioato (também sintetizados pela EuroGentec, Bélgica). Estes oligonucleótidos de RNA modificados são conhecidos por serem resistentes às endonucleases e à RNase H e por se ligarem a RNA com elevada afinidade. As sequências daqueles AONs que foram eventualmente eficazes e que foram aplicados às células do músculo *in vitro* estão apresentados abaixo. Os correspondentes AONs específicos de ratinho e do ser humano são altamente homólogos mas não totalmente idênticos.

A listagem abaixo refere-se à forma desoxi usada nos testes, nos 2'-O-metilribonucleótidos usados todos os Ts deverão ser lidos como Us.

mAON#2: 5'GCAATGTTATCTGCTT
mAON#3: 5'GTTATCTGCTTCTTCC
mAON#4: 5'CTGCTTCTTCCAGCC
mAON#5: 5'TCTGCTTCTTCCAGC
mAON#6: 5'GTTATCTGCTTCTTCCAGCC
mAON#7: 5'CTTTTAGCTGCTGCTC
mAON#8: 5'GTTGTTCTTTTAGCTGCTGC
mAON#9: 5'TTAGCTGCTGCTCAT
mAON#10: 5'TTTAGCTGCTGCTCATCTCC
mAON#11: 5'CTGCTGCTCATCTCC

hAON#4: 5'CTGCTTCCTCCAACC

hAON#6: 5'GTTATCTGCTTCCTCCAACC

hAON#8: 5'GCTTTTCTTTTAGTTGCTGC

hAON#9: 5'TTAGTTGCTGCTCTT

hAON#11: 5'TTGCTGCTCTTTTCC

Ensaio da alteração da mobilidade em gel

A eficácia dos AONs foi determinada pela sua afinidade de ligação para a sequência alvo. Apesar dos progressos recentes nos programas de simulação computacional para a previsão do enrolamento de RNAs, é difícil especular quais dos AONs projectados serão capazes de se ligarem à sequência alvo com uma afinidade relativamente elevada. Assim, realizámos ensaios da alteração da mobilidade em gel (de acordo com protocolos descritos por Bruice *et al.*, 1997). O fragmento de RNA alvo do exão 46 foi gerado por transcrição mediada por T7 a partir de um fragmento de PCR (amplificado a partir de mRNA de músculo murino ou humano, usando uma sequência iniciadora da cadeia codificadora que possui a sequência do promotor de T7) na presença de 32P-CTP. A afinidade de ligação dos AONs individuais (0,5 pmoles) aos fragmentos dos transcritos alvo foi determinada por hibridação a 37°C, durante 30 minutos, e subsequente electroforese em gel de poliacrilamida (8%). Realizámos estes ensaios para o rastreio de AONs específicos de ratinho e de ser humano (Fig. 3). Pelo menos 5 AONs diferentes específicos de

ratinho (mAON#4, 6, 8, 9 e 11) e quatro correspondendo a AONs específicos do ser humano (hAON#4, 6, 8 e 9) geraram uma alteração da mobilidade, demonstrando a sua afinidade de ligação ao RNA alvo.

Transfecção de culturas de células de músculo

Os AONs específicos do exão 46, que mostraram a afinidade de ligação ao alvo mais elevada nos ensaios de alteração da mobilidade em gel, foram seleccionados para análise da sua eficácia na indução do salto em células do músculo *in vitro*. Em todas as experiências de transfecção, incluímos um AON não específico como controlo negativo para o salto específico do exão 46. Conforme mencionado, o sistema foi primeiro estabelecido em células de músculo de ratinho. Usámos culturas em proliferação de mioblastos e de miotubos pós-mitóticos (expressando níveis mais elevados de distrofina) derivados da linha celular de músculo de ratinho C2C12. Para as experiências subsequentes em culturas celulares de músculo humano, usámos culturas primárias de células de músculo isoladas a partir de biopsias de músculo de um indivíduo não afectado e de dois doentes DMD não relacionados, portadores de uma deleção do exão 45. Estas culturas heterogéneas continham aproximadamente 20-40% de células miogénicas. Os diferentes AONs (numa concentração de 1 μ M) foram transfectados em células que usam o polímero catiónico PEI (MBI Fermentas) numa proporção de equivalentes de 3. Os AONs transfectados

nestas experiências continham um grupo 5' fluoresceína que nos permitiu determinar as eficiências de transfecção através da contagem do número de núcleos fluorescentes. Tipicamente, mais de 60% das células mostrou internalização específica nuclear dos AONs. Para facilitar a análise por RT-PCR, o RNA foi isolado 24 horas após-transfecção usando RNazol B (CamPro Scientific, The Netherlands).

RT-PCR e análise de sequências

O RNA foi sujeito a transcrição reversa usando polimerase C. therm (Roche) e uma sequência iniciadora reversa específica do exão 48. Para facilitar a detecção do salto do exão 46 da distrofina, o cDNA foi amplificado em dois ciclos de PCR, incluindo uma amplificação em ninho usando sequências iniciadoras nos exões 44 e 47 (para o sistema humano) ou exões 45 e 47 (para o sistema de ratinho). Nos mioblastos de ratinho e nas culturas celulares de miotubos, detectámos um produto truncado cujo tamanho corresponde ao exão 45 directamente ligado ao exão 47 (Fig. 4). A análise subsequente de sequências confirmou o salto específico do exão 46 a partir destes transcritos de distrofina murina. A eficiência do salto de exões foi diferente para os AONs individuais, com mAON#4 e #11 mostrando as eficiências mais elevadas. Após estes resultados promissores, focámo-nos na indução de uma modulação semelhante do "splicing" da distrofina em culturas de células de músculo humanas. Assim, detectámos

um produto truncado nas células de músculo controlo, correspondendo ao exão 45 ligado ao exão 47. É interessante que nas células de músculo derivadas de doentes foi detectado um fragmento mais pequeno que consistiu no exão 44 ligado ao exão 47. O salto específico do exão 46 dos transcritos da distrofina humana foi confirmado pelos dados de sequenciação. Esta modulação do "splicing" do transcrito da distrofina murina e humana não foi observada nas culturas celulares não transfectadas nem nas culturas transfectadas com um AON não específico.

Análise imuno-histoquímica

Pretendemos induzir o salto do exão 46 em células de músculo derivadas de doentes portadores de uma deleção do exão 45. Para restaurar a tradução e a síntese de uma proteína distrofina. Para detectar um produto distrofina quando da transfecção com hAON#8, as culturas celulares de músculo derivadas de dois doentes foram sujeitas a imunocitoquímica usando dois anticorpos monoclonais diferentes contra a distrofina (Mandys-1 e Dys-2) induzidos contra domínios da proteína distrofina com uma localização proximal e distal, respectivamente, em relação à região alvo. A análise de fluorescência revelou a restauração da síntese de distrofina em culturas de células derivadas dos dois doentes (Fig. 5). Aproximadamente pelo menos 80% das fibras coraram de forma positiva para a distrofina nas amostras tratadas.

Os nossos resultados mostram, pela primeira vez, a restauração da síntese de distrofina a partir do gene DMD endógeno nas células do músculo derivadas de doentes DMD. Esta é a confirmação da exequibilidade da modulação dirigida do "splicing" de pré-mRNA do gene da distrofina para fins terapêuticos.

Salto dirigido do exão 51

Salto simultâneo dos exões da distrofina

O salto dirigido do exão 51. Demonstrámos a exequibilidade da modulação mediada por AON do "splicing" do exão 46 da distrofina, em células de músculo de ratinho e humanas *in vitro*. Estes resultados sugeriram outros estudos para avaliar os AONs como agentes terapêuticos para DMD. Uma vez que as deleções causadoras de DMD estão agrupadas em dois pontos quentes de mutação, o salto dirigido de um exão particular pode restaurar a grelha de leitura em séries de doentes com diferentes mutações (ver Tabela 1). O exão 51 é um exão alvo interessante. O salto deste exão é terapêuticamente aplicável em doentes portadores de deleções que abrangem o exão 50, os exões 45-50, os exões 48-50, os exões 49-50, o exão 52 e os exões 52-63, o que constitui um total de 15% dos doentes da nossa base de dados de Leiden.

Projectámos uma série de dez AONs específicos humanos (hAON#21-30) dirigidos contra diferentes regiões ricas em purinas dentro do exão 51 da distrofina. Estes segmentos ricos em purinas sugeriram a presença de um elemento regulador de "splicing" de exões putativo, o qual pretendemos bloquear para induzir a eliminação daquele exão durante o processo de "splicing". Todas as experiências foram realizadas de acordo com os protocolos descritos para o salto do exão 46 (ver atrás). Os ensaios de alteração da mobilidade em gel foram realizados para identificar os hAONs com elevada afinidade de ligação para o RNA alvo. Selecionámos os cinco hAONs que apresentaram maior afinidade. Estes AONs foram usados para transfectar culturas de células de músculo humano controlo de forma a testar da exequibilidade do exão 51 *in vitro*. O RNA foi isolado 24 horas após transfecção e o cDNA foi gerado usando uma sequência iniciadora reversa específica do exão 53 ou 65. A amplificação, por PCR, da região alvo foi realizada usando diferentes combinações de sequências iniciadoras flanqueantes do exão 51. O RT-PCR e a análise de sequências revelou que conseguimos induzir o salto específico do exão 51 a partir do transcrito da distrofina humana. Subsequentemente, transfectámos dois hAONs (#23 e 29) que se observou serem capazes de induzir o salto do exão em seis culturas de células musculares diferentes, derivadas de doentes DMD portadores de uma das mutações atrás referidas. O salto do exão 51 nestas culturas foi

confirmado por RT-PCR e análise de sequências (Fig. 7). Mais importante, a análise imuno-histoquímica, usando múltiplos anticorpos induzidos contra diferentes partes da proteína distrofina, mostraram em todos os caso que, devido ao salto do exão 51, foi restaurada a síntese de uma proteína distrofina.

hAONs específicos do exão 51:

hAON#21: 5'CCACAGGTTGTGTCACCAG
hAON#22: 5'TTTCCTTAGTAACCACAGGT
hAON#23: 5'TGGCATTCTAGTTTGG
hAON#24: 5'CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC
hAON#25: 5'GGTAAGTTCTGTCCAAGCCC
hAON#26: 5'TCACCCCTCTGTGATTTTAT
hAON#27: 5'CCCTCTGTGATTTT
hAON#28: 5'TCACCCACCATCACCCCT
hAON#29: 5'TGATATCCTCAAGGTCACCC
hAON#30: 5'CTGCTTGATGATCATCTCGTT

Salto simultâneo de múltiplos exões da distrofina.

O salto de um exão adicional, como seja o exão 46 ou o exão 51, restaura a grelha para uma série considerável de diferentes mutações DMD. A gama de mutações para as quais esta estratégia é aplicável pode ser aumentada pelo salto simultâneo de mais de um exão. Por exemplo, nos

doentes DMD com uma deleção do exão 46 ao exão 50, apenas o salto de ambos os exões 45 e 51, que flanqueiam a deleção, permite restabelecer a grelha de leitura de tradução.

Salto de exões independente de ERS.

Uma mutação no exão 29 conduz ao salto deste exão em dois doentes com distrofia muscular de Becker (Ginjaar *et al.*, 2000; *EJHG*, vol. 8, p.793-796). Estudámos a exequibilidade de dirigir o salto do exão 29 atingindo o local da mutação através de AONs. A mutação está situada num segmento rico em purinas que poderá estar associado a actividade ERS. Projectámos uma série de AONs (ver abaixo) dirigidos contra sequências dentro (h29AON#1 a h29AON#6) e fora (h29AON#7 a h29AON#11) das hipotéticas ERS. Os ensaios de alteração da mobilidade em géis foram realizados (como descrito) para identificar os AONs com maior afinidade para o RNA alvo (Fig. 8). Subsequentemente, h29AON#1, #2, #4, #6, #9, #10 e #11 foram usados para transfectar culturas de miotubos humanos controlo usando o reagente de transfecção PEI. O RNA foi isolado 24 hrs pós-transfecção e o cDNA foi gerado usando uma sequência iniciadora reversa específica do exão 31. A amplificação por PCR da região alvo foi realizada usando diferentes combinações de sequências iniciadoras flanqueantes do exão 29. Este RT-PCR e subsequente análise de sequências (Fig. 8B, C) revelaram que fomos capazes de induzir o salto do exão 29 do transcrito da distrofina humana. No entanto, os AONs que

facilitaram este salto foram dirigidos contra sequências dentro e fora dos hipotéticos ERS (h29AON#1, #2, #4, #6, #9, #10 e #11). Estes resultados sugerem que o salto do exão 29 ocorre independentemente do exão 29 conter ou não um ERS e que assim a ligação dos AONs ao exão 29 muito provavelmente inactivaram um sinal de inclusão de exão em vez de uma ERS. Esta demonstração do salto de exões independente de ERS pode estender a aplicabilidade global desta terapia aos exões sem ERSs.

h29AON#1: 5'TATCCTCTGSSTGTCGCATC

h29AON#2: 5'GGTTATCCTCTGAATGTCGC

h29AON#3: 5'TCTGTTAGGGTCTGTGCC

h29AON#4: 5'CCATCTGTTAGGGTCTGTG

h29AON#5: 5'GTCTGTGCCAATATGCG

h29AON#6: 5'TCTGTGCCAATATGCGAATC

h29AON#7: 5'TGTCTCAAGTTCCTC

h29AON#8: 5'GAATTAAATGTCTCAAGTTC

h29AON#9: 5'TTAAATGTCTCAAGTTCC

h29AON#10: 5'GTAGTTCCTCCAACG

h29AON#11: 5'CATGTAGTTCCTCC

O salto do exão 46 induzido por AON *in vivo* em tecido de músculo murino.

Após os resultados promissores em células de músculo em cultura, testámos os diferentes AONs específicos

do exão 46 da distrofina de ratinho *in vivo* através da sua injeção, ligado a polietilenimina (PEI), nos músculos gastrocnêmios dos ratinhos controlados. Com mAON#4, #6 e #11, que previamente se demonstrou serem eficazes *in vitro* em células de músculo de ratinho, fomos capazes de induzir o salto do exão 46 em tecido muscular *in vivo* conforme determinado por RT-PCR e análise de sequências (Fig. 9). O salto do exão 46 *in vivo* foi dependente da dose com elevadas eficiências (até 10%) após injeção de 20 µg por músculo por dia durante dois dias sucessivos.

Referências

- Achsel *et al.*, 1996; J. Biochem. 120 ; p.53-60.
- Bruice T.W. and Lima, W.F. (1997) Biochemistry 36(16) : p. 5004-5019.
- Brunak *et al.*, 1991; J. Mol. Biol. 220 ; p. 49-65
- Dunckley *et al.* (1998) Human molecular genetics 7 : p. 1083-1090.
- Ginjaar *et al.*, 2000 ; EJHG, vol. 8, p.793-796
- Mann *et al.*, 2001 ; PNAS vol. 98, p. 42-47
- Tanaka *et al.*, 1994 Mol. Cell Biol. 14 : p. 1347-1354.
- Wilton SD *et al.*, (1999) Neuromuscular disorders 9 : p. 330-338.

Detalhes e informação básica sobre a Distrofia Muscular de Duchenne e doenças relacionadas podem ser encontrados no local da internet <http://www.dmd.nl>

Tabela 1

Exão a ser saltado	Terapêutica para deleções DMD (exões)	Frequência (%) em http://dmd.nl
2	3-7	2
8	3-7	4
	4-7	
	5-7	
	6-7	
43	44	5
	44-47	
44	35-43	8
	45	
	45-54	
45	18-44	13
	46-47	
	44	
	46-48	
	46-49	
	46-51	
	46-53	
46	45	7
50	51	5
	51-55	
51	50	15
	45-50	
	48-50	
	49-50	
	52	

(continuação)

Exão a ser saltado	Terapêutica para deleções DMD (exões)	Frequência (%) em http://dmd.nl
	52-63	
52	51	3
	53	
	53-55	
53	45-52	9
	48-52	
	49-52	
	50-52	
	52	

Lisboa, 22 de Dezembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um oligonucleótido complementar da sequência codificadora dirigido contra o interior do exão 2, 8, 29, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52 ou 53 num pré-mRNA de distrofina, em que o referido oligonucleótido complementar da sequência codificadora é capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão no referido exão e possui entre 14 e 40 nucleótidos, para a preparação de um medicamento para dirigir o "splicing" do referido pré-mRNA da distrofina numa célula capaz de efectuar a operação de "splicing".

2. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido sinal de inclusão de exão compreende uma sequência de reconhecimento de exão.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 2, em que o referido sinal de inclusão de exão está presente num exão compreendendo um par dador/aceitador de "splicing" forte.

4. Utilização de um oligonucleótido complementar da sequência codificadora dirigido contra o interior do exão 2, 8, 29, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52 ou 53 num pré-mRNA de distrofina, em que o referido oligonucleótido complementar da sequência codificadora é capaz de

especificamente inibir um sinal de inclusão de exão no referido exão e possui entre 14 e 40 nucleótidos, para a produção de uma proteína distrofina mutante ou normal.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que a referida proteína mutante da distrofina é equivalente a uma proteína distrofina de um doente Becker.

6. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que o referido oligonucleótido complementar da sequência codificadora possui entre 15 e 25 nucleótidos, ou um seu equivalente funcional capaz de especificamente inibir um sinal de inclusão de exão no referido exão.

7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, compreendendo ainda a utilização de um outro oligonucleótido complementar da sequência codificadora capaz de inibir um sinal de inclusão de exões presente num outro exão do referido pré-mRNA e contendo entre 14 e 40 nucleótidos para a preparação de um medicamento para dirigir o "splicing" do referido pré-mRNA da distrofina.

8. Um método para dirigir o "splicing" de um pré-mRNA da distrofina numa célula capaz de efectuar uma operação de "splicing", compreendendo o contacto *in vitro* do referido pré-mRNA da distrofina na referida célula com

um oligonucleótido complementar da sequência codificadora capaz de inibir especificamente um sinal de inclusão de exão do exão 2, 8, 29, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52 ou 53 no referido pré-mRNA da distrofina, o referido oligonucleótido contendo entre 14 e 40 nucleótidos, o referido método compreendendo ainda "splicing" do referido pré-mRNA.

9. Um método de acordo com a reivindicação 8, compreendendo ainda a tradução do mRNA produzido a partir do "splicing" do referido pré-mRNA.

10. Um método de acordo com a reivindicação 8 ou reivindicação 9, em que o referido mRNA codifica uma proteína funcional.

11. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-10, em que o referido contacto resulta na activação de um local de "splicing" críptico num exão contactado.

12. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, em que o referido sinal de inclusão de exão compreende uma sequência de reconhecimento de exão.

13. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-12, em que o referido sinal de inclusão de exão está presente num exão compreendendo um parador/aceitador de "splicing" forte.

14. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-13, em que a referida tradução resulta num proteína da distrofina mutante ou normal.

15. Um método de acordo com a reivindicação 14, em que a referida proteína distrofina mutante é equivalente a uma proteína distrofina de um doente Becker.

16. Um método de acordo com a reivindicação 15, em que o referido oligonucleótido complementar da sequência codificadora compreende entre 15 e 25 nucleótidos ou um seu equivalente funcional capaz de inibir especificamente um sinal de inclusão de exão no referido exão.

17. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-16, compreendendo ainda o tratamento da referida célula *in vitro* com um outro oligonucleótido complementar da sequência codificadora capaz de inibir um sinal de inclusão de exão presente num outro exão do referido pré-mRNA.

18. Um oligonucleótido complementar da sequência codificadora entre 14 e 40 nucleótidos compreendendo a sequência de ácido nucleico

hAON#4: 5'CTGCTTCCTCCAACC

hAON#6: 5'GTTATCTGCTTCCTCCAACC

hAON#8: 5'GCTTTTCTTTTAGTTGCTGC

hAON#9: 5'TTAGTTGCTGCTCTT

hAON#11: 5'TTGCTGCTCTTTTCC
hAON#21: 5'CCACAGGTTGTGTCACCAG
hAON#22: 5'TTTCCTTAGTAACCACAGGT
hAON#23: 5'TGGCATTCTAGTTTGG
hAON#24: 5'CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC
hAON#25: 5'GGTAAGTTCTGTCCAAGCCC
hAON#26: 5'TCACCTCTGTGATTTTAT
hAON#27: 5'CCCTCTGTGATTTT
hAON#28: 5'TCACCCACCATCACCT
hAON#29: 5'TGATATCCTCAAGGTCACCC
hAON#30: 5'CTGCTTGATGATCATCTCGTT

19. Um veículo de entrega de ácido nucleico compreendendo um oligonucleótido complementar da sequência codificadora capaz de inibir um sinal de inclusão de exão em pelo menos um dos exões 2, 8, 29, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52, ou 53 de um pré-mRNA da distrofina, o referido oligonucleótido contendo entre 14 e 40 nucleótidos ou o complemento do referido oligonucleótido.

20. Um veículo de entrega de ácido nucleico capaz de expressar um oligonucleótido complementar da sequência codificadora de acordo com a reivindicação 18.

21. Um veículo de entrega de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 19 ou com a reivindicação 20, compreendendo um vírus de cadeia simples.

22. Um veículo de entrega de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 19 ou com a reivindicação 20, compreendendo um vírus adeno-associado.

23. Utilização de um oligonucleótido complementar da sequência codificadora capaz de inibir um sinal de inclusão de exão em pelo menos um dos exões 2, 8, 29, 43, 45, 46, 50, 51, 52 ou 53 de um pré-mRNA da distrofina, o referido oligonucleótido contendo entre 14 e 40 nucleótidos ou um veículo de libertação de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-22, para a preparação de um medicamento.

24. Utilização de um oligonucleótido complementar da sequência codificadora capaz de inibir um sinal de inclusão de exão em pelo menos um dos exões 2, 8, 29, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52 ou 53 de um pré-mRNA da distrofina, o referido oligonucleótido contendo entre 14 e 40 nucleótidos ou veículo de entrega de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-22, para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença hereditária ou predisposição para uma doença.

25. Um animal não humano a que foi administrado um oligonucleótido complementar da sequência codificadora capaz de inibir um sinal de exclusão de exão em pelo menos um dos exões 2, 8, 29, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52 ou 53 de um pré-mRNA da distrofina, o referido oligonucleótido contendo entre 14 e 40 nucleótidos.

26. Um animal não humano de acordo com a reivindicação 25, ainda compreendendo um ácido nucleico codificador de uma proteína humana ou de um seu equivalente funcional.

27. Um animal não humano de acordo com a reivindicação 26, compreendendo ainda uma mutação silenciadora no gene codificador de um homólogo animal da referida proteína humana.

Lisboa, 22 de Dezembro de 2008

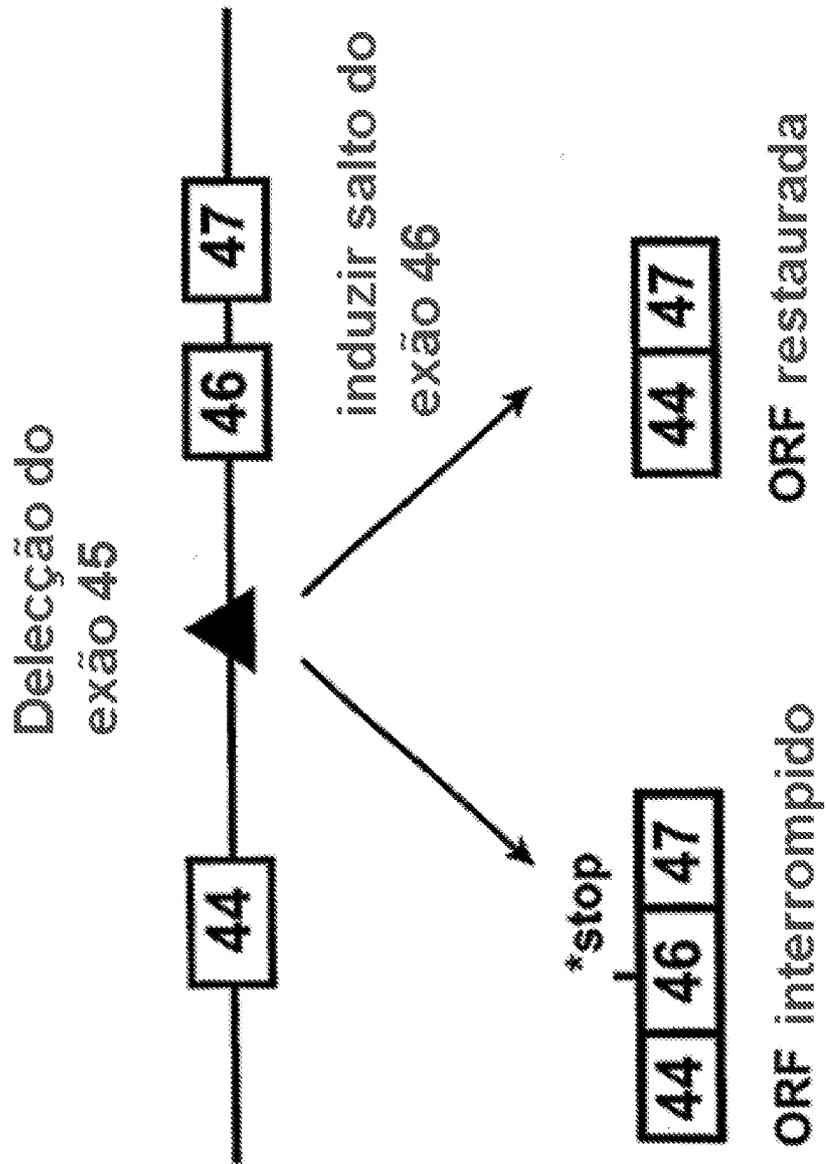


Fig. 1

Exão 46 da distrofina

Potencial sequência reguladora de "splicing"



AONs: oligonucleótidos complementares se sequência codificadora

- 1) 2'-O-metilfosforitoato RNA
- 2) grupo 5'fluorescína

Fig. 3

Ensaio de alteração da mobilidade em gel

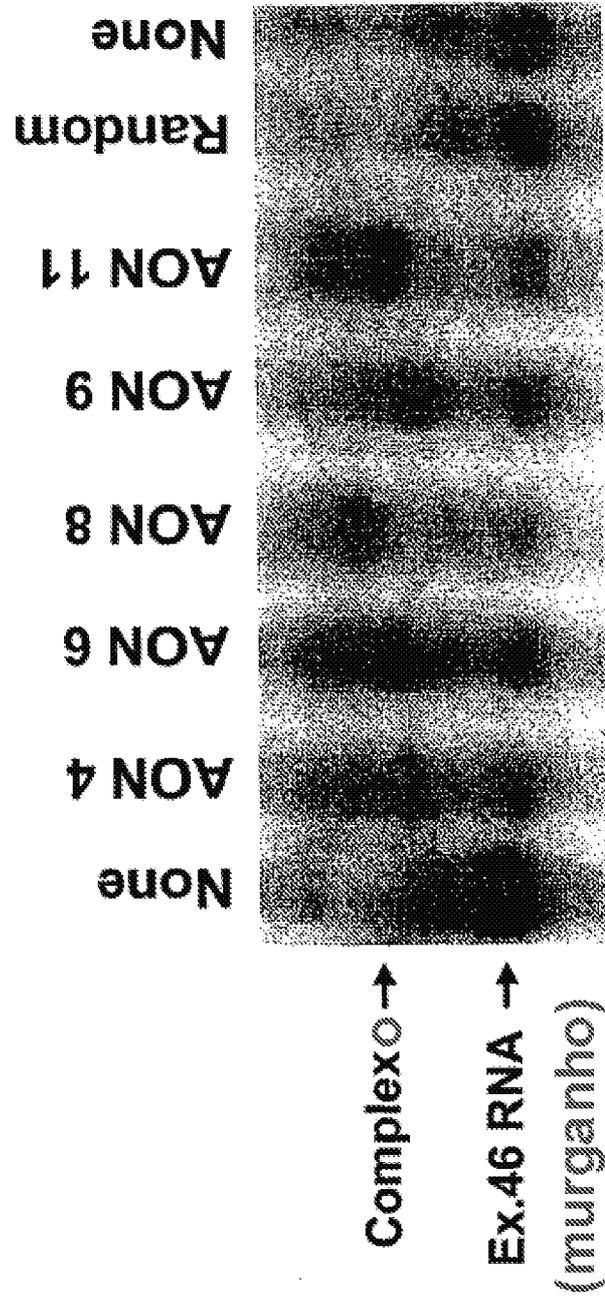


Fig. 4

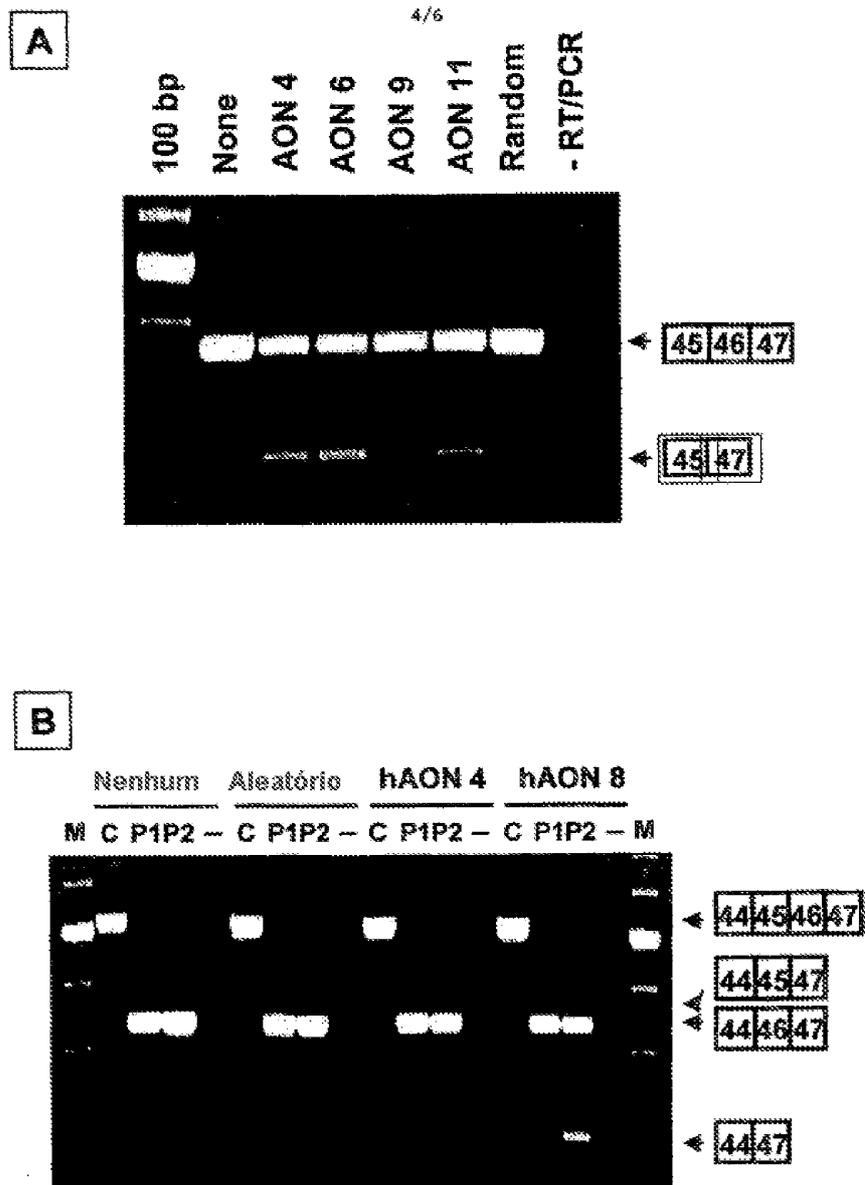


Fig. 5

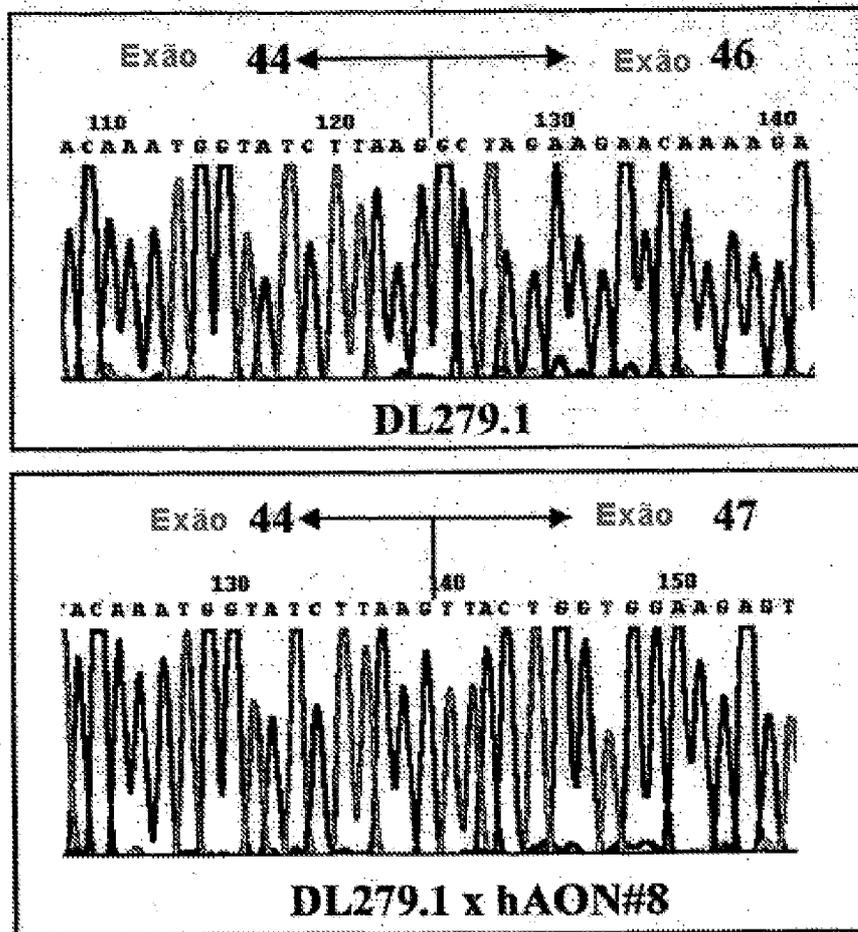
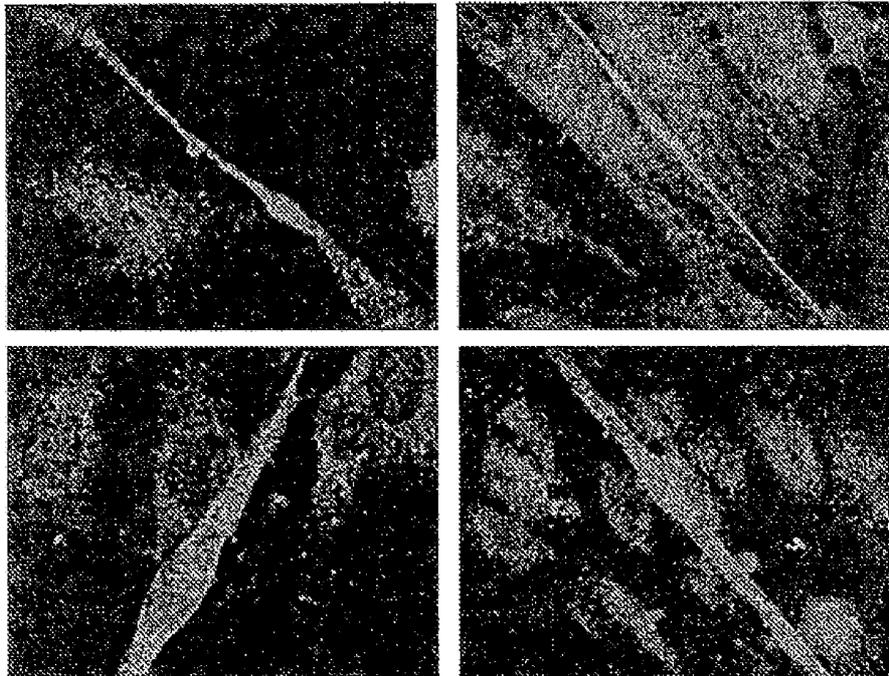


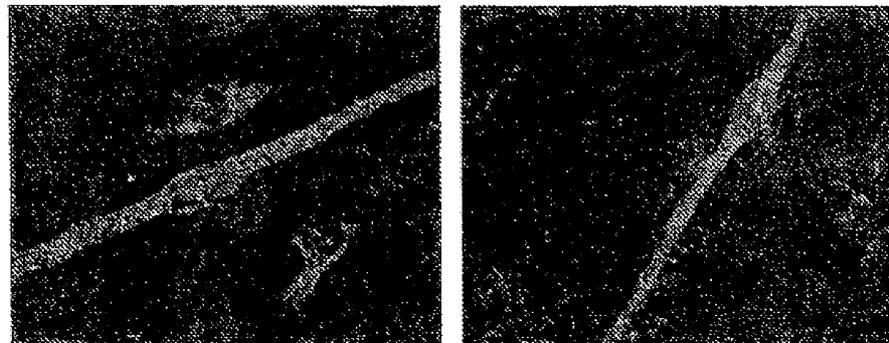
Fig. 6

distrofina
(ex.31-32)

distrofina
(ex.77-79)



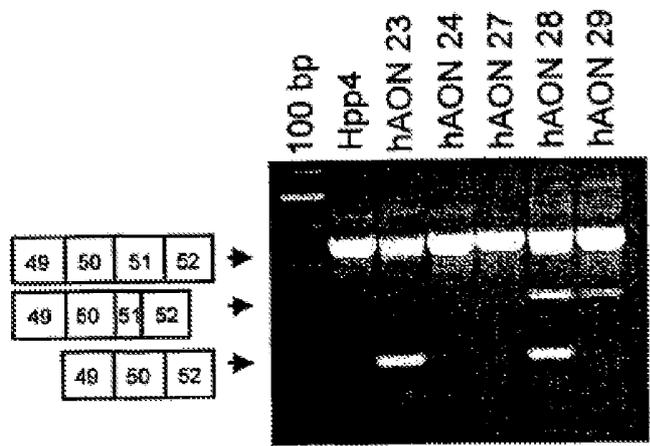
DL279.1 x AON#8



DL279.1

Fig. 7

A



B

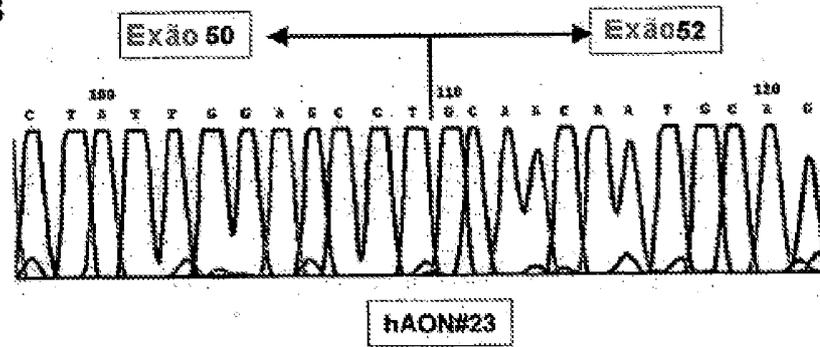


Fig. 8A

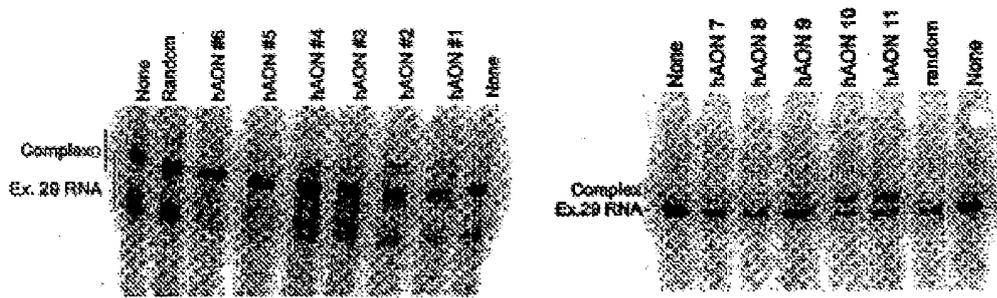


Fig. 8B

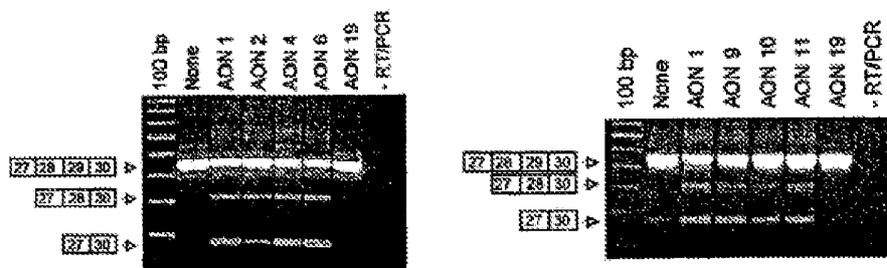
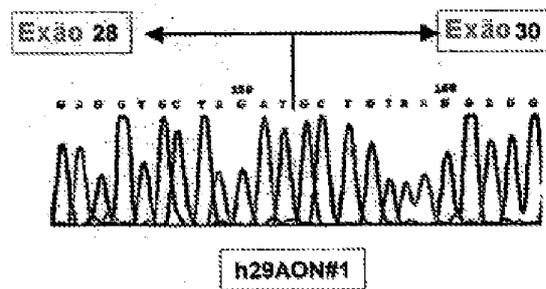


Fig. 8C



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * TANAKA et al. *Cell Biol.*, 1984, vol. 14, 1347-1354
- * ACHSEL et al. *J. Biochem.*, 1996, vol. 120, 53-60
- * BRUNAK et al. *J Mol Biol.*, 1991, vol. 220, 49-65
- * GINJAAR et al. *ELING*, 2000, vol. 6, 793-798
- * ACHSEL et al. *J. Biochem.*, 1996, 53-60
- * BRUCE T.W. ; LIMA, W.F. *Biochemistry*, 1987, vol. 26 (16), 5004-5019 ;
- * BRUNAK et al. *J Mol Biol.*, 1998, vol. 220, 49-65
- * DUNCKLEY, MG et al. *Human molecular genetics*, 1998, vol. 7, 1083-1090
- * MANN et al. *PNAS*, 2000, vol. 98, 42-47
- * TANAKA et al. *Mol Cell Biol.*, 1994, vol. 14, 1347-1354
- * WILTON SD et al. *Neuromuscular disorders*, 1999, vol. 9, 330-338