

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

| | | |
|--|--|---|
| (22) Data de pedido: 2009.05.14 | (73) Titular(es): ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN ALBINUSDREEF 2 2333 ZA LEIDEN BIOMARIN TECHNOLOGIES B.V. | NL NL |
| (30) Prioridade(s): 2008.05.14 EP 08156193 2008.05.15 US 128010 P | | |
| (43) Data de publicação do pedido: 2011.02.16 | (72) Inventor(es): GARRIT-JAN BOUDEWIJN VAN OMMEN GERARDUS JOHANNES PLATENBURG JOSEPHUS JOHANNES DE KIMPE JUDITH CHRISTINA THEODORA VAN DEUTEKOM ANNEMIEKE AARTSMA-RUS | NL NL NL NL NL |
| (45) Data e BPI da concessão: 2015.09.30 251/2015 | (74) Mandatário: CÁTIA CRISTIANA JORGE RIBEIRO AVENIDA LUÍSA TODI Nº. 33 - 1º B 2900-460 SETÚBAL | PT |

(54) Epígrafe: **MÉTODO EFICIENTE PARA EXÃO (44) SALTANDO Distrofia Muscular Duchenne e Meios Associados**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA UM MÉTODO PARA MODULAR SALTO DO GENE DA Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), NUMA CÉLULA. MAIS ESPECIFICAMENTE, O INVENTO PROPORCIONA MÉTODOS E MEIOS PARA MODULAR A FALHA DO EXÃO 44 DA DMD. A INVENÇÃO PROPORCIONA AINDA MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE PODEM SER UTILIZADAS PARA UM MÉTODO DA INVENÇÃO, MÉTODOS DE EXPRESSÃO PARA A EXPRESSÃO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO NUMA CÉLULA, E A UTILIZAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO PARA MODULAR SALTO DE DMD NUMA CÉLULA.

Descrição

Método eficiente para exão (44) saltando distrofia muscular
duchenne e meios associados

Campo da invenção

A invenção refere-se a um campo de genética, mais especificamente genética humana. A invenção em particular refere-se a uma modulação de junção do gene humano duchenne de distrofia Muscular.

Antecedentes

Miopatias são doenças que resultado assenta na degradação funcional de músculos. A distrofia muscular (MD) refere-se a doenças genéticas que são caracterizadas pelo facto de que a fraqueza progressista e a degeneração de músculos esqueléticos. A distrofia muscular duchenne (DMD) e a distrofia muscular Becker (BMD) são as mais formas mais comuns distrofia muscular na infância. Elas são doenças recessivas porque o gene responsável de DMD e BMD residem no cromossoma de X, estas mutações principalmente afetam os machos com uma incidência de cerca 1 em 3500 rapazes.

Os DMD e BMD são provocados por defeitos genéticos no DMD da distrofia do gene que codifica, um músculo proteicos que está requerido para interações entre o citoesqueleto e a matriz extracelular para manter estabilidade de fibra muscular durante a contração. O DMD é um severo, transtorno neuromuscular letal dando como resultado uma dependência em suporte de cadeira de rodas antes da idade de 12 anos e os

pacientes DMD frequentemente morrem antes da idade de trinta anos devido deficiências respiratórias - ou insuficiência cardíaca. Pelo contrário, os pacientes BMD frequentemente ficam em ambulatório até uma vida tardia, e têm expectativas de vida normal. O DMD nas mutações do gene de distrofia são caracterizados pelo facto de que a estrutura que desloca as inserções ou deleções ou mutilações pontuais sem sentido, dando como resultado a ausência de distrofia funcional. BMD mutações em geral mantem o marco de leitura intato, que permite a síntese de uma distrofia parcialmente funcional.

Diferentes tratamentos possíveis têm sido a ser investigados nos últimos 20 anos, incluindo mioblasto-transplante, terapia genética apontada com ADN, e mediado com anti sentido de exão saltitante (van Deutekom and Ommen, (2003), Nat. Ver. Genet., 4(10):774-83). Mediado com anti sentido o exão saltitante em mutações de fora do quadro de transformação apresentado em DMD pacientes com estrutura de BMD com mutações que dão por resultado a síntese de um pelo menos distrofia funcional parcial, que prolongará a viabilidade dos músculos (Aartsma-Rus and van Ommen, (2007), ARN, 13(10): 1609-24).

Exão saltitante pode ser induzido por oligonucleotidos de anti sentido (AON) dirigidos contra o doador de junção ou sítio de aceitação de junção envolvida no processo enzimático de ligação de exão, ou contra sequências internos de exão. Em geral, o doador de junção e lugares de aceitação de junção compreendem sequências conservadas e objetivos destas sequências que tem o risco inevitável de co-lugares de junção objetivo de exões adicionais de DMD ou outras transcrições de gene.

O exão 44 do DMD gene consiste em 148 pares de bases. O terapêutico saltitante de exão 44 devolveria o marco de leitura correto em DMD aos pacientes com deleções incluindo mas não limitado para exões 03-43,05-43,06-43,10-43,13-43,14-43,17-43,19-43,28-43,30-43,31-43,33-43,34-43,35- 43,36-43,37-43,38-43,40-43,41-43,42-43, 43, 45,45-54, e 45-68, ou com uma duplicação de exão 44. Além disso, para alguns DMD pacientes as mutações são de tal maneira que o simultâneo saltitante de uns ou mais exões são requeridos além do exão 44 saltitantes para devolver o marco de leitura. Exemplos limitantes de tais mutações são sem sentido as mutilações pontuais nos exões flanqueantes 43 ou 45, requerendo exão 43+44 saltitante ou exão 44+45 saltitantes respectivamente. O mencionado anteriormente mutações totais ocorrem em cerca de 6-8 % de todos os DMD pacientes. A maioria de proteínas de distrofia resultante serão no domínio da haste central da proteína, deixar o N-terminal essencial actino-união domínio e a união de domínio C-terminal para distrobrevina e sintrofina, e o?-dístroglicano-C-terminal domínio rico-cisteína, intato.

Descrição

A presente divulgação identifica quatro regiões diferentes em exão 44 que são particularmente adequadas para induzir saltitantes de exão 44. A divulgação fornece assim um método para modular a junção de exão 44 do gene de DMD numa célula, o método que compreende o fornecimento da dita célula com uma molécula que enlaça numa sequência de nucleótidos que compreende o bilhete de sequência n°. 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU; bilhete de sequência n°. 2: 5'-GGGAACAUGC UAAAUAC, bilhete de sequência n°. 3: 5'-AGACACAAAUUCCUGAGA, ou bilhete de sequência n°. 4: 5'-

CUGUUGAGAAA. Esta molécula preferencialmente liga-se ou é complementar para qualquer sequência N°: 1, 2, 3, ou 4 quando o bilhete de sequência NO:1, 2, 3, ou mais é apresentado dentro do exão 44 do DMD pré-ARNM.

Em toda parte da aplicação, a expressão "pular induzido" é sinônimo de "modulado splicing".

Foi encontrada uma molécula que enlaça a uma sequência de nucleótidos que compreende bilhete de sequência SEQ ID NO. 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU; SEQ ID NO. 2: 5'-GGGAACAUGC UAAAUAC, SEQ ID NO.3: 5'- AGACACAAAUUCCUGAGA, ou SEQ ID NO.4: 5'-CUGUUGAGAAA resulta numa eficácia alta de saltitante de exão 44 em células fornecidas de esta molécula. Além disso, nenhuma das sequências indicadas é derivada de partes conservadas de lugares de junção de junção. Consequentemente, a dita molécula não é uma junção diferencial possível a mediano de outros exões do DMD pré-ARNM ou exões de outros genes. Adicionalmente, outro (imune)toxiciti é preferencialmente evitado para se evitar CpG pares na molécula que enlaça a uma sequência de nucleótidos como aqui definido.

O exão saltitante refere-se à indução numa célula de um ARNM amadurecido que não conte com um exão particular que está presente normalmente ali dentro. O exão saltitante é conseguido subministrando uma célula expressa do pré-ARNM do dito ARNM, com uma molécula capaz de fazer interferência com sequências tais como, por exemplo, o doador de junção ou sequência do aceitante de junção tem requerido para permitir o processo enzimático de junção, ou que está capaz de fazer a interferência com um sinal de inclusão de exão requerido para

reconhecimento de um esticar de nucleótidos como um exão para ser incluído no ARNM. O termo pré-ARNM refere-se a um não-processado ou ARNM processado parcialmente que está sintetizado de uma forma de ADN no núcleo da célula por transcrição.

Certos métodos da invenção aliviará uma ou mais características de uma célula miogénica ou célula muscular de um DMD doente com deleções incluindo, mas não limitados para, exões 03-43, 05-43, 06-43, 10-43, 13-43, 14-43, 17-43, 19-43, 28-43, 30-43, 31-43, 33-43, 34-43, 35-43, 36-43, 37-43, 38-43, 40-43, 41-43, 42-43, 43, 45, 45-54, e 45-68, ou com uma duplicação de exão 44. Além disso, a remoção de um exão flanqueante, tal como, por exemplo, exão 43 ou exão 45, por causa da uma mutilação pontual sem sentido no exão flanqueante, quer dar-se por resultado uma cópia fora da estrutura. O adicional saltitante de exão 44, em combinação com o saltitante do exão flanqueante, devolverá o marco de leitura do gene DMD em células miogénicas ou células musculares de DMD pacientes. Exemplos não exaustivos de tais mutações são sem sentido de mutilações pontuais nos exões flanqueantes 43 ou 45, requerendo o exão 43+44 saltitante ou exão 44+45 saltitante respetivamente.

Numa forma de realização, um método da invenção pode também aliviar um ou mais características de uma célula miogénica ou célula muscular de um forte BMD doente, às características de um suave BMD doente. As características de uma célula de um DMD ou BMD doente incluem o aumento da captação de cálcio por células musculares, aumento da síntese de colagénio, morfologia alterada, biossíntese de lipídeo alterado, aumento da tensão oxidante, e/ou sarcolema danificada. Formas de

realização preferidas de um método da invenção são depois definidas aqui.

Numa forma de realização de acordo com a divulgação, uma molécula conforme aqui definido pode ser uma molécula de composto que enlaça e/ou é complementária à sequência específica, ou uma proteína tal como uma proteína de união de ARN ou um dedo de zinco natural proteico que tenha sido modificada para poder enlaçar com a sequência de nucleótidos indicada num ARN molécula. Métodos para selecionar moléculas de composto que enlaçam sequências de nucleótidos específicos são, por exemplo, descritos em PCT/NL01/00697 e patente estado unidense 6,875,736, que são aqui incorporados por referência. Métodos projetando ARN-proteínas de dedo de zinco de união que enlaçam sequências de nucleótidos específicas são descritos por Friesen e Darby, natureza estrutural biologia 5: 543- 546 (1998) que é aqui incorporada por referência. União para uma da sequência específica SEQ ID NO: 1, 2, 3, ou sequência 4, preferencialmente no contexto de exão 44 de DMD pode ser avaliada através de técnicas conhecidas por um técnico especializado. Uma técnica preferida de acordo com a divulgação é o ensaio de deslocamento de mobilidade do gel como se descreve em EP 1 619 249. Numa forma de realização preferida de acordo com a divulgação, uma molécula é dito para enlaçar com uma das sequências específicas assim que uma união da dita molécula a uma sequência de sequência etiquetada SEQ ID NO.1, 2,3 ou 4 é detetável num ensaio de deslocamento de mobilidade de gel. Alternativamente ou em combinação com a forma de realização precedente, uma molécula é um oligonucleotidos que é complementar ou substancialmente complementar para SEQ ID NO.1, 2, 3, ou 4 ou parte da mesma como aqui definido. O

termo complementar "substancialmente" usado neste contexto indica que uma ou duas desadaptações podem ser permitidas visto que a funcionalidade, por exemplo, induzindo saltitantes de exão 44, são ainda aceitáveis.

A divulgação fornece um método para projetar uma molécula, preferencialmente num oligonucleotidos capazes de induzir o saltitante de exão 44 do gene de DMD. Primeiro o dito oligonucleotidos é selecionado para enlaçar com um de SEQ ID NO.1, 2, 3, ou 4 ou partes como aqui definido anteriormente. Posteriormente, num método preferido da divulgação pelo menos de um dos aspetos seguintes tem de ser tido em conta para o desenho, melhorando da dita qualquer outra molécula:

- a molécula não contem um CpG,
- a molécula não contem um motivo de quarteto de g,
- a molécula foi aceite pela ARN cinética de união e/ou propriedades termodinâmicas.

A presença de um CpG num oligonucleotidos é normalmente associada com um aumento de imunogenicidade do dito oligonucleotidos (Dorn e Kippenberger, Curr Opin Mol Ther 2008 10(1) 10- 20). Este aumento da imunogenicidade é indesejado uma vez que pode induzir a descomposição de fibras musculares. A imunogenicidade pode ter constatado num modelo animal para valorização da presença de CD4+ e/ou CD8+ células e/ou mononucleocitos inflamatórios de infiltração em biopsia muscular do dito animal. Imunogenicidade também pode ser constatada em sangue de um animal ou de um ser humano tratado com um oligonucleotidos da invenção para detetar a presença de um anticorpo neutralizante e/ou um anticorpo que reconhece o dito oligonucleotidos usando um imunoensaio standard

conhecido do técnico especializado. Um aumento em imunogenicidade pode ter sido constatado para detecção da presença de uma quantidade crescente de um anticorpo neutralizante ou um anticorpo que reconhece o dito oligonucleotidos usando um imunoensaio standard.

Um oligonucleotidos que compreende um motivo de G-quarteto de que tende a formar um quadruplex, um multimer ou um agregado formado pelo Hoogsteen em emparelhamento de bases de quatro oligonucleotidos mono catenários (Cheng and Van Dyke, Gene. 1997 Sep 15,197 (1-2):253-60), o qual é naturalmente não desejado: como um resultado da eficiência dos oligonucleotidos é esperado para ser diminuído. A multimerização ou agregação é preferencialmente constatada por polipoliacrilamida standard não-desnaturalizada das técnicas de eletroforese de gel conhecidas de um técnico especializado. Numa forma de realização preferida, menos que 20% ou 15%, 10%, 7%, 5% ou menos de uma quantidade total de um oligonucleotidos da divulgação tem a capacidade para multimerizar ou agregar o constatado usando o ensaio acima-mencionado.

A divulgação permite projetar um oligonucleotidos com aceitável ARN de cinética de união e/ou propriedades termodinâmicas. O ARN de cinética de união e/ou propriedades termodinâmicas são pelo menos determinadas em parte pela temperatura de fusão de um oligonucleotidos (T_m ; calculadas com o oligonucleotidos de calculadora de propriedades (www.unc.edu/?cail/biotoool/oligo/index.html) para o catenário ARN usando o T_m básico e o modelo de vizinho), e/ou a energia livre do AON-objetivo exão complexo (usando ARN versão de estrutura 4.5). Se um T_m é também alto, o

oligonucleotidos é esperado para ser menos específico. Uma energia livre e T_m aceitável vão depender da sequência do oligonucleotidos. Conseqüentemente, é difícil de dar gamas preferidas para cada um destes parâmetros. Um T_m aceitável pode ser disposto entre 35 e 65°C e uma energia livre aceitável pode ser disposta entre 15 e 45 kcal/mol.

De acordo com a divulgação, o técnico especializado pode conseqüentemente primeiro escolher um oligonucleotidos com um potencial terapêutico composto como união e/ou sendo complementar para SEQ ID NO:1, 2, 3, ou 4 de exão 44 ou suas partes como definido aqui. O técnico especializado pode controlar os oligonucleotidos e é capaz de enlaçar com as ditas sequências como aqui definido anteriormente. Opcionalmente numa segunda fase, ele pode usar a invenção para mais otimizar o dito oligonucleotidos para controle da ausência de CpG, a ausência de um motivo de quarteto de G, e/ou para otimização da sua energia T_m e/ou livre do AON-objeto complexo. Ele pode tentar desenhar um oligonucleotidos no qual o CpG e/ou o não G-quarteto motivo de estar presente e/ou em que uma energia T_m mais aceitável e/ou livre ser obtidos para eleger uma sequência diferente de exão 44 (por exemplo SEQ ID NO:1, 2, 3, ou 4) ao qual o oligonucleotidos é complementar. Alternativamente, se um oligonucleotidos complementar esticar dentro de SEQ ID NO:1, 2,3 ou 4 de exão 44, compreende um CpG, um G-quarteto de motivo e/ou não têm uma energia aceitável T_m e/ou livre, o técnico especializado pode melhorar qualquer destes parâmetros para diminuir o comprimento do oligonucleotidos, e/ou para eleger um diferente dentro qualquer da sequência SEQ ID NO: 1, 2, 3, ou 4 ao qual o oligonucleotidos é complementar e/ou para alterar a química do

oligonucleotidos.

Como um exemplo, se um elege SEQ ID NO:1, diferente oligonucleotidos que eram projetados e que foram encontrados para enlaçar esta sequência: SEQ ID NO: 5, 49, e 54. O oligonucleotidos que compreende SEQ ID NO:5 foi encontrado para ter a mais ótima ARN cinética de união e/ou propriedades termodinâmicas, tais como a mais Tm ótima. Quando nós testamos a funcionalidade destes oligonucleotidos para induzir o saltitante de exão 44, foi confirmado que um oligonucleotidos que compreende SEQ ID NO:5 é o mais eficaz destes quatro oligonucleotidos. Cada um destes oligonucleotidos é funcional no sentido da invenção. No entanto, um oligonucleotidos que compreende SE-Q ID NO:5 é o mais preferencial oligonucleotidos identificado que enlaça e/ou é complementar para SEQ ID NO:1.

Em qualquer fase do método, um oligonucleotidos da divulgação é preferencialmente um oligonucleotidos, que é para além disso capaz de exibir um nível aceitável de uma atividade funcional. Uma atividade funcional do dito oligonucleotidos é preferencialmente para induzir o saltitante de exão 44 do DMD gene a uma certa amplitude, para prover um individual com uma distrofia funcional com proteico e/ou ARNM e/ou pelo menos decrescente em parte da produção de uma distrofia aberrante com proteico e/ou ARNM. Cada uma destas características é depois disso aqui definido. Tal atividade funcional pode ser medida num tecido muscular ou numa célula muscular de um individual ou invitro numa célula. A avaliação da funcionalidade pode ser realizada num nível ARNM, preferencialmente usando RT-PCR. A avaliação da funcionalidade pode ser realizada num nível proteico,

preferencialmente usando análise da mancha ocidental ou análise de Imunofluorescência de secções cruzadas. Numa forma de realização preferida da divulgação, um oligonucleotidos é dito para induzir o saltitante de exão 44 de um gene de DMD, testado quando numa célula muscular de um DMD doente, por RT PCR, o exão 44 saltitante a percentagem ser de pelo menos 30%, ou pelo menos 35%, ou pelo menos 40%, ou pelo menos 45%, ou pelo menos 50%, ou pelo menos 55%, ou pelo menos 60%, ou pelo menos 65%, ou pelo menos 70%, ou pelo menos 75%, ou pelo menos 80%, ou pelo menos 85%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou 100%.

Numa forma de realização preferida, tal oligonucleotidos é preferencialmente um medicamento. Mais preferencialmente, o dito medicamento é para prevenção ou tratamento DUCHENNE distrofia Muscular ou Becker distrofia Muscular num individual ou num doente. Como aqui definido um DMD pré-ARNM preferencialmente significa que o pré-ARNM de um gene de DMD de um DMD ou BMD doente. Um doente é preferencialmente destinado para significar um doente com DMD ou BMD ou um doente susceptível para tornar-se DMD ou BMD devido aos seus antecedentes genéticos.

No caso de um DMD doente, um oligonucleotidos usado preferencialmente correto pelo menos numa das DMD mutações como presentes no gene DMD do dito doente e conseqüentemente preferencialmente criarão uma distrofia que parecerão um BMD distrofia: a dita distrofia preferencialmente será uma distrofia funcional como depois disso aqui definido.

No caso de um BMD doente, um oligonucleotidos como usado preferencialmente correto pelo menos um do BMD de mutações

como presentes no gene DMD do dito doente e conseqüentemente preferencialmente criarão um, ou mais de um, distrofia, que será mais funcional que a distrofia que foi originalmente presente no dito BMD doente. Ainda mais preferencialmente, o dito medicamento tem aumentado a produção de um funcional ou distrofia funcional com mais proteico e/ou ARNM e/ou pelo menos em parte diminui a produção de uma aberrante ou distrofia menos funcional e tem proteico e/ou ARNM num individual.

Preferencialmente, um método da invenção aumenta a produção de uma distrofia mais funcional que tem proteico e/ou ARNM e/ou diminui a produção de um aberrante ou distrofia menos funcional e tem proteico e/ou ARNM num doente, induzindo e/ou promoção saltitante de pelo menos exão 44 do DMD pré-ARNM como identificado aqui num ou mais células, células musculares preferencialmente do dito doente. Crescente da produção de uma distrofia mais funcional proteica e/ou ARNM e/ou decrescente da produção de uma distrofia aberrante proteica e/ou ARNM num doente é habitualmente aplicada num DMD doente. Crescente da produção de uma distrofia mais funcional ou funcional e/ou ARNM é habitualmente aplicada num BMD doente.

Conseqüentemente um método preferido é um método, onde num doente ou numa ou mais células do dito doente, produção de uma distrofia mais funcional ou funcional proteica e/ou ARNM é aumentada e/ou a produção de uma distrofia aberrante proteica e/ou ARNM no dito doente é diminuída, onde o nível do dito aberrante ou distrofia funcional mais proteica e/ou ARNM é constatado por comparação ao nível da dita distrofia e/ou ARNM no dito doente com a aparição do método.

Como aqui definido, uma distrofia funcional é preferencialmente uma distrofia de tipo selvagem correspondente a uma proteína com da sequência de aminoácidos como identificada na SEQ ID NO: 55. uma distrofia funcional é preferencialmente uma distrofia, que tem um domínio de união de actina no seu N parte terminal (primeiro 240 aminoácidos no N término), uma cisteína-rica domínio (aminoácido 3361 até 3685) e um C domínio terminal (última 325 aminoácidos em o C término) cada um destes domínios apresentam uma distrofia do tipo selvagem como conhecido a um técnico especializado. O aminoácido aqui indicado assemelha-se a aminoácidos da distrofia de tipo selvagem sendo representada pela SEQ ID NO: 55. noutra forma de realização, uma distrofia funcional é uma distrofia, que amostra pelo menos para alguma amplitude uma atividade de uma distrofia de tipo selvagem. "Pelo menos alguma extensão" preferencialmente significa que pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% de uma atividade correspondente a um tipo selvagem funcional de distrofia. Neste contexto, uma atividade de uma distrofia de tipo selvagem é preferencialmente a união para a actina e ao distrofia-associada glicoproteína complexa (DGC) (Aartsma-Rus A et al, (2006). Entradas no leiden Duchenne Musculares Base de dados de mutação de distrofia: uma perspectiva de tipos de mutação e casos paradoxais que confirmam a regra da estrutura de leitura, Muscle Nerve, 34: 135-144.). União de distrofia para actina e ao DGC complexo pode ser visualizada por qualquer co-imuno precipitação usando extratos de proteína total ou análise de imunofluorescência de secções cruzadas, de uma biopsia de um músculo que tem suspeito para ser distrófico, como conhecido a um técnico especializado. Sofrimento de pessoas de Duchenne distrofia muscular habitualmente têm uma mutação na distrofia de gene que

codifica e que impede a síntese da proteína completa, por exemplo uma parada prematura previne a síntese do término C da proteína. Em Becker distrofia muscular o gene de distrofia também compreende uma mutação comparada com o tipo selvagem mas a mutação faz habitualmente e não inclui uma parada prematura e o termo C da proteína é habitualmente sintetizada. Como resultado de uma proteína de distrofia funcional é sintetizada e tem pelo menos a mesma atividade em espécie como uma proteína de tipo selvagem, ainda não necessariamente a mesma quantidade de atividade. Numa forma de realização preferida, uma proteína de distrofia funcional significa uma distrofia de estrutura gene. O genoma de um BMD individual habitualmente codifica uma proteína de distrofia que compreende o N da parte terminal (primeiro 240 aminoácidos em N término), uma cisteína-rico domínio (aminoácido 3361 até 3685) e um C domínio terminal (última 325 aminoácidos em o C término) mas o seu domínio com forma de bastão central pode ser mais curto que o principal de uma distrofia de tipo selvagem (Aartsma-Rus A et al, (2006), entradas no leiden Duchenne base de dados da mutação de distrofia Muscular: uma perspectiva de tipos de mutação e casos paradoxais que confirmam a regra da estrutura de leitura, Muscle Nerve, 34: 135-144)). Os aminoácidos aqui indicados assemelham-se a aminoácidos da distrofia de tipo selvagem sendo representada por SEQ ID NO:55. Exão-skipping para o tratamento de DMD é preferencialmente mas não dirigido apenas para superar uma parada prematura no pré-ARNM para saltitante um exão no domínio da haste formou um domínio para corrigir o marco de leitura e permitir a síntese da restante proteína da distrofia incluir o termo C, ainda assim que a proteína é um tanto menor como resultado de um domínio de haste menor. Numa forma de realização preferida, um individuo

com DMD e sendo tratado por usar um oligonucleotidos como aqui definido será fornecida uma distrofia, que amostra pelo menos para alguma amplitude uma atividade de uma distrofia de tipo selvagem. Mais preferencialmente, se o dito individuo é um Duchenne doente ou é suspeito para ser um Duchenne doente, uma distrofia funcional é uma distrofia comparável em funcionalidade a uma distrofia de um individuo com BMD: preferencialmente a dita distrofia é capaz de interagir com ambas a actina e o DGC, mas o seu domínio com forma de bastão central pode ser mais curto que o principal de uma distrofia de tipo selvagem (Aartsma-Rus A et al, (2006), entradas no leiden Duchenne base de dados de mutação de distrofia Muscular: uma perspectiva de tipos de mutação e casos paradoxais que confirmam a regra de estrutura de leitura, *Muscle Nerve*, 34: 135- 144)). O domínio de haste central de distrofia de tipo selvagem compreende 24 tipos de espertina repete (Aartsma- Rus A et al, (2006), entradas no leiden Duchenne a base de dados de mutação de distrofia Muscular: uma perspectiva de tipos de mutação e casos paradoxais que confirmam a regra da estrutura de leitura, *Muscle Nerve*, 34: 135-144)). Por exemplo, um domínio com forma de bastão central de uma distrofia como aqui fornecido pode compreender 5 para 23, 10 para 22 ou 12 para 18 tipo espertina repete enquanto isto pode enlaçar com a actina e para DGC.

Decrescente da produção de uma distrofia aberrante no dito doente ou numa célula do dito doente pode ter sido constatado num nível ARNM e preferencialmente significa que 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% ou menos da quantidade inicial de ARNM de distrofia aberrante, é para além disso detetável por RT PCR. Uma distrofia aberrante ARNM ou proteína também é denominada neste caso como um não

funcional ou menos para distrofia não-funcional ou semi-funcional ARNM ou proteína. Uma distrofia de pré-ARNM não-funcional é preferencialmente conduzida para fora da proteína de distrofia da estrutura, que significa que a distrofia tem proteico produzido e/ou detetado. Uma não proteína de distrofia funcional é preferencialmente uma distrofia proteica que não é capaz de enlaçar actina e/ou membros do DGC proteico complexo. Uma distrofia não-funcional proteica ou distrofia ARNM faz habitualmente que não têm, ou não codifica uma proteína de distrofia com um término C intato da proteína.

Decrescente da produção de uma distrofia funcional num doente ou numa célula do dito doente pode ser constatada num nível ARNM (por RT-PCR análise) e preferencialmente significar que uma quantidade detetável de um funcional ou em ARNM de distrofia de estrutura é detetável por RT PCR. Noutra forma de realização, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais do ARNM de distrofia detetável é um funcional ou em ARNM de distrofia de estrutura.

Decrescente da produção de uma distrofia funcional num doente ou numa célula do dito doente pode ser constatada num nível proteico (por análise de imunofluorescência e borrão ocidental) e preferencialmente significar que uma quantidade detetável de uma proteína de distrofia funcional é detetável por imunofluorescência ou análise de mancha ocidental. Noutra forma de realização, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais da proteína de distrofia detetável é uma proteína de distrofia funcional.

Um aumento ou uma diminuição é preferencialmente constatado

num tecido muscular ou numa célula muscular de um indivíduo ou num doente por comparação à quantidade presente no dito indivíduo ou doente antes do tratamento com a dita molécula ou composição da invenção. Alternativamente, a comparação pode ser feita com um tecido muscular ou uma célula do dito indivíduo ou doente, que tenha ainda não sido tratado com o dito oligonucleotidos ou composição em caso de o tratamento ser local.

Em um mais aspeto, ali está provido um método para aliviar um ou mais sintoma (s) de Duchenne distrofia Muscular ou Becker distrofia Muscular num indivíduo ou aliviar um ou mais característica (s) de uma célula miogénica ou muscular do dito indivíduo, o método que compreende a administração para o dito indivíduo um oligonucleotidos ou uma composição como aqui definido.

Ali é subsequentemente fornecido um método para aumentar, induzindo ou promovendo um saltitante de um exão de um pré-ARNM de distrofia numa célula que expressa o dito pré-ARNM num sofrimento individual de Duchenne distrofia Muscular ou Becker distrofia Muscular, o método que compreende a administração para o dito indivíduo um oligonucleotidos ou uma composição como aqui definida.

Adicionalmente provido é um método para aumentar a produção de uma distrofia funcional proteica e/ou decrescente da produção de uma proteína de distrofia aberrante numa célula, da dita célula que compreende um pré-ARNM de um gene que codifica a distrofia numa proteína de distrofia aberrante, o método que compreende o fornecimento da dita célula com um oligonucleotidos ou composição da invenção e que permite a

tradução de ARNM produzido da junção do dito pré-ARNM. Numa forma de realização, o dito método é realizado in vivo, por exemplo usando um cultivo de célula. Preferencialmente, o dito método é in vivo no dito indivíduo.

Neste contexto, crescente da produção de uma proteína de distrofia funcional aqui definida.

Aliviar um ou mais sintoma (s) de Duchenne distrofia Muscular ou Becker distrofia Muscular num indivíduo usando uma molécula ou uma composição da invenção pode ser constatado por qualquer dos seguintes ensaios: prolongamento do tempo para perda de caminhada, melhoria de resistência muscular, melhoria da capacidade para elevar peso, melhoria do tempo tomado para ascensão do solo, melhoria no tempo de caminhada de metro de neve, melhoria no tempo tomado para alpinismo de escalas de quatro, melhoria da qualidade de função da perna, melhoria da função pulmonar, melhoria da função cardíaca, melhoria da qualidade de vida. Cada um destes ensaios é conhecido do técnico especializado. Como um exemplo, a publicação de Manzur et al (Manzur AY et al, (2008), Glucocorticoid Corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy (review), Wiley publishers, The Cochrane collaboration.) dá uma explicação extensiva de cada um destes ensaios. Para cada um destes ensaios, assim que uma melhoria detetável ou prolongamento de um parâmetro medido num ensaio tenha sido encontrada, preferencialmente significará aquele ou mais sintomas de Duchenne distrofia Muscular ou Becker distrofia Muscular tenha sido aliviado num indivíduo ao usar uma molécula ou composição da invenção. Melhora detetável ou prolongamento é preferencialmente uma melhora estatisticamente significativa ou prolongamento como se

descreve em Hodgetts et al (Hodgetts S., et al, (2006), doenças Neuromusculares, 16: 591-602).

Alternativamente, o alívio dum ou mais sintoma (s) de Duchenne distrofia Muscular ou Becker distrofia Muscular pode ser constatado para lá do medido de uma melhoria de uma característica de uma fibra muscular relativa para a sua função, integridade e/ou sobrevivência, a dita característica sendo constatado no doente auto. Tais características podem ser constatadas nas células, o nível de tecido de um doente dado. Um alívio de umas ou mais características podem ser constatados por qualquer dos ensaios seguintes numa célula miogénica ou célula muscular de um doente: captação de cálcio reduzido por células musculares, diminuídas sínteses de colagénio, morfologia alterada, biossíntese de lipídeo alterado, tensão oxidante diminuída, e/ou função de fibra de músculo aperfeiçoado, integridade, e/ou sobrevivência. Estes parâmetros são normalmente constatados usando imunofluorescência e/ou histoquímica análise de seções transversais de biópsias musculares.

Um oligonucleotidos como aqui usados preferencialmente compreende um anti sentido oligonucleotidos ou anti sentido oligúrico nucleótido. Numa forma de realização preferida um exão saltitante da técnica é aplicado. Exão saltitante interfere com os processos de junção natural que ocorrem dentro de uma célula eucariótica. Em eucariotas mais alto a informação genética para proteínas no ADN da célula é codificado em exões que são separados entre si por sequências intrónicas. Estes in trones são nalguns casos muito largos. A maquinaria de transcrição de eucariotas gera um pré-ARNM que contém ambos exões e in trones, enquanto a maquinaria de

junção, frequentemente já durante a produção do pré-ARNM, gera a zona de codificação real para a proteína para a junção tem junta os exões presentes no pré-ARNM.

Saltitante de exão ocasiona ARNM amadurecido pelo menos um exão pulado. Assim, quando os ditos códigos de exão para aminoácidos, exão saltitante conduz à expressão de um produto alterado. A tecnologia para saltitante de exão é habitualmente dirigida em direção ao uso de oligonucleotidos de anti sentido (AONs). Muito deste trabalho é feito no *mdx* modelo de rato para Duchenne de distrofia muscular. Tem *mdx* de rato uma mutilação sem sentido em exão 23. Apesar do *mdx* da mutação, que deveria impedir a síntese de uma proteína de distrofia funcional raro, distrofia de origem natural positiva de fibras têm sido observadas em *mdx* de tecido muscular. Esta distrofia-positiva de fibras são pensadas para surgirem de um mecanismo claramente de origem natural saltitante de exão, quaisquer mutações devidas a somático ou através de junção alternativa. AONs dirigido para, respetivamente, o 3' e/ou 5' lugares de junção de entrones 22 e 23 em pré-ARNM de distrofia, têm sido mostrados para incomodar fatores envolvidos normalmente em remoção de entrone 23 de modo que também o exão 23 foi removido do ARNM (alteram J, et al. Entrega o sistema de morfolino oligonucleotidos expressão de distrofia de restaurações de bodiwido e melhora a patologia da distrofia. Nat Med 2006,12 (2):175-7, Lu QL, et al. Quantidades funcionais de distrofia têm produzido para saltitantes do mutado de exão no *mdx* de rato distrófico. Nat Med 2003,6:6, Lu QL, et al. Entrega sistêmica de anti sentido oligo-ribonucleotidos da expressão de distrofia de restaurações em músculos esqueléticos do corpo. Proc Natl Acad EEUU de Sci 2005,102(1):198-203, Mann

CJ, et al, aperfeiçoado anti sentido oligonucleotidos exão induzido saltitante no mdx modelo de rato de distrofia muscular. J Gene Med 2002,4(6):644-54 ou Graham IR, et al, em direção a uma inibição terapêutica de exão de distrofia 23 que empalma em mdx de rato muscular induzida por anti sentido oligo-ribonucleotidos (splicomers): otimização de sequência de um objetivo usando oligonucleotidos matrizes. J Gene Med 2004,6(10): 1149-58).

Pelo apontado saltitante de um exão específico, um DMD fenótipo é convertido num mais suave BMD fenótipo. O saltitante de um exão é preferencialmente induzido pela união de sequências de AONs internos de exão objetivos. Um oligonucleótido dirigido em direção a um exão tem sequência habitualmente interna de amostra não recobrimento com sequências de não-exão. E preferível não estar sobreposto com os lugares de junção pelo menos não no que concerne a, como estes estão presentes no intrão. Um oligonucleótido dirigido em direção um exão tem sequência interna preferencialmente não conta com uma sequência complementar para um intrão adjacente. Adicionalmente é provido de um oligonucleótido de acordo com a invenção, onde o dito oligonucleótido, ou um equivalente funcional deste, é para inibir a inclusão de um exão de um pré-ARNM de distrofia em ARNM produzida pela junção do dito pré-ARNM. Um exão saltitante técnica é preferencialmente aplicado de maneira a que ausência de um exão de ARNM produzido de pré-ARNM de distrofia gera uma zona de codificação para uma mais funcional - mais curto ainda assim - proteína de distrofia. Neste contexto, inibindo a inclusão de um exão preferencialmente significa que a detecção do original da distrofia aberrante de ARNM e/ou proteína é diminuída como aqui definido anteriormente.

Dentro do contexto da invenção, um funcional equivalente de um oligonucleótido preferencialmente significa que um oligonucleótido como aqui definido em que um ou mais nucleótidos têm sido substituídos e em que uma atividade do dito equivalente funcional é retido para pelo menos alguma amplitude. Preferencialmente, uma atividade do dito equivalente funcional está fornecida de uma proteína de distrofia funcional. Da atividade do dito equivalente funcional é conseqüentemente constatada preferencialmente para quantificar a quantidade de uma distrofia funcional proteica ou para quantificar a quantidade de um ARNM de distrofia funcional. Uma proteína de distrofia funcional (ou uma distrofia funcional ARNM) é aqui definida preferencialmente como sendo uma proteína de distrofia (ou uma proteína de distrofias codificadas por o dito ARNM) ser capaz de enlaçar actina e membros do DGC na proteína. A avaliação da dita atividade de um oligonucleótido é preferencialmente feito por RT PCR (m-RNA) ou por análise de imunofluorescência ou borrarão acidental (proteína). A dita atividade é preferencialmente retida para pelo menos alguma amplitude quando representa pelo menos 50%, ou pelo menos 60%, ou pelo menos 70% ou pelo menos 80% ou pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou mais da atividade correspondente ao dito oligonucleótido o equivalente funcional deriva de. Tal atividade pode ser medida num tecido muscular ou numa célula muscular de um individuo ou invitro numa célula por comparação para uma atividade de um correspondente oligonucleótido do dito oligonucleótido do equivalente funcional derivado. Em toda parte esta aplicação, quando a palavra oligonucleótido é usada pode ser substituída por um equivalente funcional deste como aqui definido.

Numa forma de realização preferida, um oligonucleótido da divulgação, que compreende uma sequência que enlaça e/ou é complementar a uma sequência de exão 44 de pré-ARNM de distrofia como anteriormente definido é de maneira que a parte complementar e pelo menos 50% do comprimento do oligonucleótido da divulgação, mais preferencialmente pelo menos 60%, ainda mais preferencialmente pelo menos 70%, ainda mais preferencialmente pelo menos 80%, ainda mais preferencialmente pelo menos 90% ou também mais preferencialmente pelo menos 95%, ou também mais preferencialmente 98% ou também mais preferencialmente pelo menos 99%, ou também mais preferencialmente 100%. Numa forma de realização mais preferida, um oligonucleótido da divulgação consiste numa sequência que está complementar para dividir a pré-ARNM de distrofia como definido aqui. Exemplo, um oligonucleótido pode compreender uma sequência que está complementar para dividir a pré-ARNM de distrofia como aqui definido e sequências flanqueantes adicionais. Em uma forma de realização mais preferida da divulgação, o comprimento da dita parte complementar do dito oligonucleótido é de pelo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, ou 60 nucleótidos. Preferencialmente, as sequências flanqueantes adicionais são utilizadas para modificar a união de uma proteína ao oligonucleótido, ou para modificar uma propriedade termodinâmica do oligonucleótido, mais preferencialmente para modificar o objetivo do ARN da afinidade de união.

É assim não requerido absolutamente que todos as bases na

região de complementaridade são capazes de emparelhamento com bases na cadeia oposta. Por exemplo, quando projetar o oligonucleótido um pode querer para incorporar por exemplo um resíduo que não com base na cadeia complementária. Desadaptações podem, para alguma amplitude, ser permissão, se o baixo das circunstâncias na célula, o esticam de nucleótidos é suficientemente capaz de hibridação à parte complementária. Neste contexto, "suficientemente" significa preferencialmente que usar um ensaio de deslocamento de mobilidade de gel como se descreve no exemplo 1 da EP1619 249, a união de um oligonucleótido é detetável. Opcionalmente, o dito oligonucleótido pode ainda ser testado por transfusão em células musculares de pacientes. Saltitante do exão apontado pode ser constatado por RT-PCR (como descrito em EP1619249)). As regiões complementárias podem ser preferencialmente projetadas de maneira que, combinada quando, eles são específicos para o exão no pré-ARNM. Tal especificidade pode ser criada com vários comprimentos de regiões complementares como esta depende das sequências reais em outro (pré-)mRNA do sistema. O risco que um ou mais pré-ARNM será capaz de hibridar ao oligonucleótido diminuições com dimensão crescente do oligonucleótido. É claro que oligonucleotidos que compreendem desadaptações na região de complementaridade mas que retêm a capacidade para hibridar e/ou enlaçar com as apontadas regiões no pré-ARNM, podem ser usados na presente divulgação. No entanto, preferencialmente, pelo menos as partes complementares não compreendem tais desadaptações como estes habitualmente têm uma eficiência mais alta e uma especificidade mais alta, que oligonucleotidos com tais desadaptações num ou em regiões complementares. Pensa-se que, as forças de hibridação mais altas, (isto é num número crescente de interações com a

cadeia oposta) são favoráveis em crescentes da eficiência do processo de interferência com a maquinaria de junção do sistema. Preferencialmente, a complementaridade é entre 90 e 100%. Em geral este permite durante 1 ou 2 descasamentos num oligonucleótido de 20 nucleótidos ou 1, 2,3 ou 4 desadaptações num oligonucleótido de 40 nucleótidos, ou 1, 2, 3, 4,5 ou 6 desadaptações num oligonucleótido de 60 nucleótidos.

Uma molécula preferida da divulgação compreende ou consiste numa sequência baseada em nucleótidos que estão sem sentido numa sequência selecionada de exão 44 do DMD pré-ARNM. A sequência do DMD pré-ARNM é preferencialmente selecionada da SEQ ID NO.1: 5'- GUGGCUAACAGAAGCU; SEQ ID NO.2: 5'- GGGAACAUGCUGAAAAC, SEQ ID NO.3: 5'- AGACACAAAUCCUGAGA, e SEQ ID NO.4: 5'-CUGUUGAGAAA.

A molécula da invenção é preferencialmente uma molécula isolada.

A molécula do dispositivo é preferencialmente uma molécula de ácido nucleico ou uma molécula baseada em nucleótido ou um oligonucleótido ou um anti sentido oligonucleótido que ligações e/ou é complementar a uma sequência de exão 44 selecionada a partir da SEQ ID NO:1, 2,3 ou 4.

Uma molécula preferida da invenção compreende ou consiste em aproximadamente 8 para aproximadamente 60 nucleótidos, mais preferida de aproximadamente 10 para aproximadamente 50 nucleótidos, mais preferida de aproximadamente 17 para aproximadamente 40 nucleótidos, mais preferida de aproximadamente 18 para aproximadamente 30 nucleótidos, mais

preferida de aproximadamente 18 para aproximadamente 24 nucleótidos, mais preferida aproximadamente 20 nucleótidos, tais como 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos ou 23 nucleótidos.

Uma molécula preferida da invenção compreende ou consiste em de 8 para 60 nucleótidos, mais preferida de 10 para 50 nucleótidos, mais preferida de 17 para 40 nucleótidos, mais preferida de 18 para 30 nucleótidos, mais preferida de 21 para 60, mais preferida de 22 para 55, mais preferida de 23 para 53, mais preferida de 24 para 50, mais preferida de 25 para 45, mais preferida de 26 para 43, mais preferida de 27 para 41, mais preferida de 28 para 40, mais preferida de 29 para 40, mais preferida de 18 para 24 nucleótidos, ou preferencialmente compreende ou consiste em 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, ou 60 nucleótidos.

Em determinadas formas de realização, a divulgação fornece uma molécula que compreende ou consiste numa sequência de nucleótidos de anti sentido selecionada das sequências de nucleótidos de anti sentido representadas na tabela 1A.

Uma molécula ou molécula de ácido nucleico da divulgação que enlaça e/ou é complementária e/ou é anti sentido a um nucleótido com sequência de nucleótidos: SEQ ID NO. 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU preferencialmente compreende ou consiste numa sequência de nucleótidos de anti sentido da SEQ ID NO.5; SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO14, SEQ

ID NO15, SEQ ID NO16, SEQ ID NO17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 22, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 27, SEQ ID NO 28, SEQ ID NO 29, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 34, SEQ ID NO 35, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 38, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO ou SEQ ID NO 54. Uma molécula preferida cujos alvos desta região do DMD pré-ARNM compreende ou consiste da sequência de nucleótidos de anti sentido de SEQ ID NO:5, SEQ ID NO 49, ou SEQ ID NO 54. Mais preferido o oligonucleótido compreende ou consiste em que a sequência de nucleótidos de anti sentido de SEQ ID NO:5.

Numa maior forma de realização preferida, a invenção fornece uma molécula que compreende ou consiste numa sequência de nucleótidos de anti sentido SEQ ID NO 5: 5'-UCAGCUUCUGUUAGCCACUG. Foi encontrado que esta molécula é muito eficaz na modulação da junção de exão 44 do DMD gene em células musculares. Esta molécula preferida da invenção compreende SEQ ID NO:5 compreende desde 21 para 60, mais preferencialmente de 22 para 55, mais preferencialmente de 23 para 53, mais preferencialmente de 24 para 50, mais preferencialmente de 25 para 45, mais preferencialmente de 26 para 43, mais preferencialmente de 27 para 41, mais preferencialmente de 28 para 40, mais preferencialmente de 29 para 40, ou preferencialmente compreende ou consiste em 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, ou 60 nucleótidos.

Numa outra forma de realização preferida, a divulgação fornece uma molécula que compreende ou consiste numa

sequência de sequência de nucleótidos de anti sentido de SEQ ID NO 49 ou 54. Estas moléculas preferidas da divulgação que compreendem qualquer SEQ ID NO:49 ou SEQ ID NO:54 mais compreendem de 18 para 60, mais preferidas de 18 para 55, mais preferidas de 20 para 53, mais preferidas de 24 para 50, mais preferidas de 25 para 45, mais preferidas de 26 para 43, mais preferidas de 27 para 41, mais preferidas de 28 para 40, mais preferidas de 29 para 40, ou preferencialmente compreendem ou consistem em 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, ou 60 nucleótidos.

Numa forma de realização preferida, uma molécula da divulgação que está no anti sentido para SEQ ID NO 2: 5'-GGGAACAUGC UAAA UAC preferencialmente compreende ou consiste na sequência de nucleótidos de anti sentido da SEQ ID NO 43 ou SEQ ID NO 44. Estas moléculas preferidas da divulgação compreendem qualquer SEQ ID NO 43 ou SEQ ID NO:44, mais compreendem de 17 para 60 nucleótidos, mais preferidos de 18 para 30 nucleótidos, mais preferidos de 21 para 60, mais preferidos de 22 para 55, mais preferidos de 23 para 53, mais preferidos de 24 para 50, mais preferidos de 25 para 45, mais preferidos de 26 para 43, mais preferidos de 27 para 41, mais preferidos de 28 para 40, mais preferidos de 29 para 40, mais preferidos de 18 para 24 nucleótidos, ou preferencialmente compreende ou consiste em 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, ou 60 nucleótidos.

E ainda numa forma de realização adicional, uma molécula da

divulgação que está no anti sentido para SEQ ID NO 3: 5'-AGACACAAAUCCUGAGA preferencialmente compreende ou consiste numa sequência de nucleótidos de anti sentido de SEQ ID NO 47 ou SEQ ID NO 48. Estas moléculas preferidas da divulgação que compreende qualquer bilhete de SEQ ID NO:47 ou SEQ ID NO:48 compreende mais de 17 para 60 nucleótidos, mais preferencialmente de 18 para 30 nucleótidos, mais preferencialmente de 17 para 60, mais preferencialmente de 22 para 55, mais preferencialmente de 23 para 53, mais preferencialmente de 24 para 50, mais preferencialmente de 25 para 45, mais preferencialmente de 26 para 43, mais preferencialmente de 27 para 41, mais preferencialmente de 28 para 40, mais preferencialmente de 29 para 40, mais preferencialmente de 18 para 24 nucleótidos, ou preferencialmente compreende ou consiste em 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, ou 60 nucleótidos.

Ainda numa outra forma de realização adicional, uma molécula da divulgação que está no anti sentido para sequência SEQ ID NO 4: 5'-CUGUUGAGAAA preferencialmente compreende ou consiste numa sequência de nucleótidos de anti sentido de SEQ ID NO 45 ou SEQ ID NO 46. Estas moléculas preferidas da divulgação que compreendem qualquer SEQ ID NO:45 ou SEQ ID NO:46 compreendem mais de 11 para 60 nucleótidos, mais preferencialmente de 11 para 30 nucleótidos, mais preferencialmente de 11 para 60, ou preferencialmente compreendem ou consistem em 11, 12, 14, 15, 16,17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, ou 60 nucleótidos.

Uma sequência de nucleótidos de uma molécula da invenção pode conter resíduos de ARN, ou um ou mais resíduos de ADN, e/ou um ou mais análogos de nucleótidos ou equivalentes, como será adicionalmente detalhado daqui para a frente.

É preferido que uma molécula da invenção compreende um ou mais resíduos que são modificados para aumentar a resistência de nuclease, e/ou para aumentar a afinidade do nucleótido de anti sentido para a sequência de objetivo. Conseqüentemente, numa forma de realização preferida, a sequência de nucleótidos de anti sentido compreende pelo menos um nucleótido análogo ou equivalente, onde um nucleótido análogo ou equivalente é definido como um resíduo com uma base modificada, e/ou uma espinha dorsal modificada, e/ou uma ligação de internucleosida não natural, ou uma combinação de estas modificações.

Numa forma de realização preferida, o nucleótido análogo ou equivalente compreende uma espinha dorsal modificada. Exemplos de tais colunas vertebrais proveem da coluna vertebral de morfolino, coluna vertebral de carbamato, coluna vertebral de siloxano, sulfureto, coluna vertebral de sulfóxido e sulfona, formacetilo e tioformacetilo coluna vertebral, metilenoformacetilo coluna vertebral, riboacetilo coluna vertebral, alceno que contém coluna vertebral, sulfamato, coluna vertebral de sulfonato e sulfonamida, coluna vertebral de metilenoimino e metilenoimidazino, e coluna vertebral de amida. Fosforodiamidato oligómeros de morfolino são modificados oligonucleótides de espinha dorsal que têm previamente sido investigados como agentes de anti sentido. Os oligonucleótides de morfolino têm uma espinha dorsal sem carga na que o desoxirribose de açúcar de ADN é

substituído por um de seis membrados do anel e da ligação de fosfodiéster é substituído por um fosforodiamidato da ligação. Os oligonucléotides de morfolino são resistentes a degradação de enzimático e aparecem como agentes de função anti sentido para a tradução notável ou interferindo com a junção de pré-ARNM em vez do para a ribonucleica ativante H. Os oligonucléotides de morfolino têm sido libertados para células de cultivo do tecido por métodos que fisicamente rompem a membrana celular, e um estudo que compara diferentes destes métodos encontrados com carga de arranhão foi o método mais eficaz de entrega; no entanto, porque a espinha dorsal de morfolino é sem carga, lípidos catiónicos não são mediadores eficazes de morfolino oligonucleótido da captação em células. Uma formação triple tem demonstrado que o informe último por um morfolino oligonucleótido e, por causa da espinha dorsal não-iônica, este estudo mostrou que o morfolino oligonucleótido foi capaz da formação triple em ausência de magnésio.

É mais preferido do que a ligação entre os resíduos numa espinha dorsal não incluir um átomo de fósforo, tal como uma ligação que está formada por cadeia curta o alquilo ou ciclo alquilo das conexões da internucleosida, heteroátomos misturados e alquilo ou ciclo alquilo de conexões internucleosidas, ou um ou mais conexões de internucleosida tem heteroátomos ou heterocíclicos de ligações em cadeia.

Um nucleótido preferido análogo ou equivalente compreende um ácido nucleico peptídico (PNA), com uma espinha dorsal de poliamida modificada (Nielsen, et al. (1991) ciência 254,1497-1500)). PNA-baseado em moléculas são verdadeiras imitam as moléculas de ADN em quanto um reconhecimento de par

embase. A espinha dorsal do PNA está composta de unidades de N- (2-aminoetil) -glicina ligadas por enlaces peptídicos, onde as nucleobases são ligadas a uma espinha dorsal por enlaces de carbonilo de metileno. Uma espinha dorsal alternativa compreende um mono-carbono estendido pirrolidina PNA monómero (Govindaraju et Kumar (2005) Chem. Commun, 495-497)). Uma vez que a espinha dorsal de um PNA molécula não tem carrega grupos de fosfato, PNA-ARN híbridos são normalmente mais estáveis que ARN de ARN ou híbridos de ADN de ARN, respetivamente (Egholm et al (1993) natureza 365,566-568).

Uma espinha dorsal mais preferida compreende um análogo de nucleótido de morfolino ou equivalente, em que a ribose ou desoxirribose de açúcar é substituída por um 6-membered anel de morfolino. Um análogo de nucleótido mais preferido ou equivalente compreende um fosforodiamidato de oligómeros de morfolino (PMO), no qual a ribose ou desoxirribose de açúcar é substituída por um 6-membered anel de morfolino, e a ligação de fosfodiéster aniónico entre anéis de morfolino adjacente é substituída por uma ligação não-iónico de fosforodiamidato.

Em ainda numa forma de realização adicional, um nucleótido análogo ou equivalente da invenção compreende uma substituição de uma não-conexão de oxigénios na ligação de fosfodiéster. Esta ligeira modificação desestabiliza mas adiciona resistência significativa para a degradação de nuclease Um nucleótido preferido análogo ou equivalente compreende fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforotioato, fosfotriester, aminoalcilfosfotriester, H-fosfonato, metilo e outro fosfonato alquilo incluindo 3'-

alcileno fosfonato, 5'-alcileno fosfonato e fosfonato quiral, fosfinato, fosforamidato incluindo 3'-amino fosforamidato e aminoalcilfosforamidato, tionofosforamidato, tionoalcilfosfonato, tionoalcilfosfotriester, selenofosfato ou boranofosfato.

Um mais nucleótidos preferidos análogos ou equivalentes da invenção compreendem uma ou mais frações de açúcar que são mono- ou di-sustituídos em o 2', 3' e/ou 5' posição tais como um oh; -F; substituído ou não substituído, inferior linear ou ramificado (C1-C10) alquilo, alquenilo, alquinilo, alcarilo, alilo, ou aralquilo, que pode ser interrompido por um ou mais heteroátomos; O, s-, ou alquilo de n; O, s-, ou alquenilo de n; O, ou de s alquinilo de n; O, s-, ou alilo de n; O-alquilo-O-alquilo, metoxi, aminopropoxi; metoxietoxi; -dimetilaminoxietoxi; e dimethylaminoethoxiethoxi. A metade de açúcar pode ser uma piranose ou seu derivado, ou um deoxipiranose ou seu derivado, preferencialmente gibosa ou seu derivado, ou desoxirribose ou derivado de um preferido derivatizado de metade de açúcar que compreende um ácido nucleico bloqueado (LNA), no qual o átomo de 2'-carbon é ligado ao 3' ou 4' átomo de carbono do anel de açúcar desse modo formar uma metade de açúcar bicíclica. Um preferido LNA compreende 2'-O.4'-C-ethileno ácido nucleico unido (Morita et al. 2001. Acido nucleico Res suplemento n°. 1: 241-242)). Estas substituições devolvem a ribonuclease análoga ou equivalente de nucleótido H e nuclease resistente e aumentam a afinidade para o objetivo ARN.

Noutra outra forma de realização, um nucleótido análogo ou equivalente da invenção compreende uma ou mais modificações de base ou substituições. Bases modificadas compreendem bases

naturais e sintéticas tais como inosina, xantina, hipoxantina e outro aza, de aza, hidróxido, halo, tio, tiol, alquilo, alquenilo, alquinilo, trioalcilo derivados de bases de pirimidina e purina que são ou serão conhecidos na técnica.

É compreendido por um técnico especializado que não é necessário para todas as posições num anti sentido oligonucleótido para ser modificado uniformemente. Adicionalmente, mais de um dos mencionados anteriormente análogos ou equivalentes podem ser incorporados em um único anti sentido oligonucleótido ou também a uma única posição dentro de um anti sentido oligonucleótido. Em determinadas formas de realização, um anti sentido oligonucleótido da invenção tem pelo menos dois diferentes tipos de análogos ou equivalentes.

Um anti sentido preferido oligonucleótido de acordo com a invenção compreende um 2'-O alquilo anti sentido de fosforotioato oligonucleótido, tais como 2'-O-metilo ribose modificada (ARN), 2'-O-etilo ribose modificada, 2'-O-propilo ribose modificada, e/ou derivados substituídos destas modificações tais como têm derivados de halogenado.

Um anti sentido mais preferido de oligonucleótido de acordo com a invenção compreende um 2'-O ribose de fosforotioato de metilo.

Ele também pode ser compreendido por um técnico especializado que oligonucleótides de anti sentido diferentes podem ser combinados para saltitantes eficientemente de exão 44. Numa forma de realização preferida da divulgação, uma combinação de pelo menos dois oligonucleótides de anti sentido são

usados em um método da invenção, tais como dois oligonucléotides de anti sentido diferentes, três oligonucléotides de anti sentido diferentes, quatro oligonucléotides de anti sentido diferentes, ou cinco oligonucléotides de anti sentido diferentes.

Um anti sentido de oligonucleótido pode ser ligado a uma metade que realça a captação do anti sentido oligonucleótido em células, células miogénicas preferencialmente ou células musculares. Exemplos de tais frações são colesterol, hidratos de carbono, vitaminas, biotina, lípidos, fosfolípidos, péptidos de penetração de célula incluindo mas não têm limitada para antena pedia, fazem encaixe de frivolidé, transportam e carregam positivamente aminoácidos tais como oligoarginina, poli-arginina, oligolisina ou poli-lisina, domínios de união de antigénio tais como proporcionados por um anticorpo, um Fab fragmento de um anticorpo, ou um único domínio de união de antigénio de cadeia tais como um cameloide único do domínio da união de antigénio do domínio.

Um anti sentido preferido de oligonucleótido compreende um ligado com péptido PMO.

Um oligonucleótido da invenção pode ser indiretamente administrado usando meios adequados conhecidos na arte. Um oligonucleótido pode por exemplo ser fornecido para um individuo ou uma célula, tecido ou órgão do dito individuo em forma de um vetor de expressão em que o vetor de expressão codifica uma cópia que compreende o dito oligonucleótido. O vetor de expressão é preferencialmente introduzido numa célula, tecido, órgão ou individual através de um veículo da entrega do gene. Numa forma de realização preferida, ali está

provido um vetor de expressão com base num viral que compreende uma cassette de expressão ou uma cassette de transcrição que aciona a expressão ou transcrição de uma molécula como aqui identificado. Uma célula pode ser fornecida de uma molécula capaz de interferência com sequências essenciais para dar resultados altamente eficazes saltitante de exão 44 por anti sentido derivado com plasmídeo oligonucleótido da expressão ou expressão viral proporcionada por adenovírus- ou adeno -associado vetores baseados em vírus. A expressão é preferencialmente conduzida por um promotor de polipolimerase III, tais como um U1, um U6, ou um U7 ARN promotor. Um veículo de entrega preferido é um vetor viral tal como um adeno-associado vetor de vírus (AAV), ou um vetor retrovívico tal como um vetor de lentivírus (Goyenvalle um, et al. Resgate de músculo distrófico através de U7 snRNA-mediado exão saltitante. *Ciência* 2004,306(5702):1796-9, De Angelis FG, et al. moléculas de snRNA quimérica levando sequências de anti sentido contra as junções de junção de exão 51 do pré-ARNM de distrofia indução um exão saltitante e restauração de uma síntese de distrofia em Delta 48-50 DMD células. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002,99(14):9456-61 ou Denti MA, et al. Chimerico adeno-associado vírus/anti sentido U1 nuclear pequeno ARN síntese de distrofia eficaz de e função muscular por tratamento local de mdx ratos. *Zumbar Gene Ther* 2006,17(5):565-74) e similares. Também, plasmídeos, cromossomas artificiais, plasmídeos utilizáveis para recombinação homóloga apontada e integração no genoma humano de células que podem ser adequadamente para entrega de um oligonucleótido como aqui definido. Preferido para a corrente invenção são estes vetores em que a transcrição é conduzida de PolIII promotores, e/ou em que as transcrições são na forma de fusão com U1 ou U7 transcrições, que produzem bons

resultados para pequenas transcrições. É dentro da habilidade do artesão desenhar adequadas transcrições. As preferidas são as transcrições de PolIII. Preferencialmente, numa forma de fusão com um U1 ou U7 (ver o mesmo Goyenvalle A et al, De Angelis FG et al ou Denti MA et al.). Tais fusões podem ser geradas como descreve (Gorman L, et al, alteração estável de pre-mRNA modificadas U7 nuclear pequeno RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 1998,95(9): 4929-34 ou Suter D, et al, Double-target antisentido U7 snRNAs promovem saltitantes eficazes de um exão aberrante em três humano beta-talassémico mutações. Hum Mol Genet 1999,8(13):2415-23).

O oligonucleótido pode ser libertado como é. No entanto, o oligonucleótido também pode ser codificado pelo vetor viral. Habitualmente, isto é em forma de uma transcrição de ARN que compreende a sequência do oligonucleótido numa parte da cópia.

Um anti sentido preferido de oligonucleótido do sistema de expressão é um adenovírus associado vírus (AAV) - baseado no vetor. A única cadeia dupla de AAV-baseado nos vetores têm sido desenvolvidas e podem ser usadas para expressão prolongada de sequências de nucleótidos de anti sentido pequeno para alta eficácia de saltitantes de exão 44 de DMD.

Um vetor preferido de AAV-baseado compreende uma cassete de expressão que está conduzida por um promotor de III de polipolimerase (Pol III). Um preferido Pol III promotor é, por exemplo, um U1, um U6, ou um U7 ARN de promotor.

A invenção consequentemente também fornece um vetor com base viral, que compreende um Pol III-cassete de expressão

conduzida pelo promotor para lá da expressão de um anti sentido oligonucleótido da invenção para induzir um saltitante de exão 44 do DMD gene.

Melhoras em meios para fornecimento de um individual ou uma célula, tecido, órgão do dito individual com um oligonucleótido e/ou um equivalente deste, são antecipados, para considerar os progressos que tem já sido até aqui conseguidos. Futuras melhorias podem naturalmente ser incorporadas para obtenção do mencionado efeito em reestruturação de ARNM usando um método da invenção. Um oligonucleótido e/ou um equivalente deste pode ser libertado como é para um individual, uma célula, tecido ou órgão do dito individual. Quando a administração de um oligonucleótido e/ou um equivalente deste, é preferencial um oligonucleótido e/ou um equivalente deste é dissolvido numa solução que está compatível com o método de entrega. Células musculares ou miogenicas podem ser fornecidas de um plasmídeo para um anti sentido de oligonucleótido da expressão subministrando o plasmídeo numa solução aquosa. Alternativamente, um plasmídeo pode ser proporcionado por transfusão usando agentia de transfusão conhecida. Para intravenoso, subcutâneo, intramuscular, intratecal e/ou administração intraventricular é preferível que a solução seja uma solução fisiológica. Preferido particularmente na invenção é o uso de um excipiente ou agentia de transfusão que ajudará a entrega de cada um dos componentes como definido aqui a uma célula e/ou numa célula, preferencialmente uma célula muscular. Preferido são agentia de excipientes ou transfusão capazes de formar complexos, nano partículas, micelas, vesículas e/ou lipossomas que fornecem cada constituinte como definido aqui, complexo ou retidos numa vesícula ou lipossoma através de uma

membrana celular. Muitos destes excipientes são conhecidos na arte. Excipientes adequados ou agentes de transfusões compreendem poli etilamina (PEI; ExGen500 (MBI Fermentas), LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) ou seus derivados, ou polímeros catiónicos similares, incluindo copolímeros de poli propilenoimina ou poli etilenimina (PECs) e derivados, sintético amfifílicos (SAINT-18), lipofectin™, DOTAP e/ou proteínas capsidas virais que são capazes de auto montagem em partículas que podem abrir para cada constituinte como definido aqui uma célula, preferencialmente uma célula muscular. Tais excipientes têm sido mostrados para eficientemente entregar um oligonucleótido tais como ácidos nucleicos de anti sentido a uma ampla variedade de células cultivadas, incluindo células musculares. A sua alta potencialidade de transfusão é combinada com uma toxicidade baixa em termos de sobrevivência de célula total. A facilidade de modificação estrutural pode utilizar-se para permitir mais modificações e a análise (in vivo) das características de transferência do ácido nucleico e toxicidade.

Lipofectina representa um exemplo de um lipossoma agente de transfusão. Ele consiste em dois componentes de lipídeo, um lipídeo catiónico N-(1-(2,3 dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonium de cloreto (DOTMA) (cp. DOTAP que é o sal de metil sulfato) e uma dioleoilfosfatidiletanolamina de lipídeo neutro (droga). O componente neutro media a libertação intracelular. Outro grupo de sistemas de entrega são os poliméricos de nano partículas.

Policatiões tais como dietilaminoetilaminoetilo (DEAE)-dextrana, que são bem conhecidos como transfusão de ADN

reactivo podem ser combinados com butilcianoacrilato (PBCA) e hexilcianoacrilato (PHCA) para formular nano partículas catiónicas que podem abrir para cada constituinte como aqui definido, preferencialmente um oligonucleótido através das membranas de célula em células.

Além destes materiais de nano partícula comum, a proteína de péptido catiónico oferece uma abordagem alternativa para formular um oligonucleótido com coloides. Este sistema de nano partícula coloidal pode formar os assim chamados proticles, que podem ser preparados por um processo de auto embalagem simples para a libertação intracelular mediana de um oligonucleótido. Um técnico especializado pode selecionar e acomodar qualquer um sobre ou outros excipientes de alternativa comercialmente-disponíveis e sistemas de entrega para embalar e abrir para um oligonucleótido para uso na invenção corrente para abrir para o tratamento de Duchenne distrofia Muscular ou Becker distrofia Muscular em seres humanos.

Adicionalmente, um oligonucleótido poderia ser de maneira covalente ou ligado a não-de maneira covalente com um ligante objetivo desenhado para especificamente facilitar a captação numa célula, citoplasma e/ou o seu núcleo. Tal ligante poderia compreender (i) um composto (incluindo mas não limitado para péptido (-lice) estruturas) reconhecendo a célula, tecido ou órgão específico elementos que facilitam a captação celular e/ou (ii) um composto químico capaz de facilitar a captação em células e/ou a libertação intracelular de um oligonucleótido de vesículas, por ex. endossomas ou lisossomas.

Consequentemente, numa forma de realização preferida, um oligonucleótido é formulado numa composição ou um medicamento ou uma composição, que é fornecido de pelo menos um excipiente e/ou um ligante objetivo para entrega e/ou um dispositivo de entrega deste a uma célula e/ou aumentando a sua entrega intracelular. Consequentemente, a invenção também encerra uma composição aceitável farmacologicamente que compreende um oligonucleótido e que compreende ainda pelo menos um excipiente e/ou um ligante objetivo para entrega e/ou um dispositivo de entrega do dito oligonucleótido a uma célula e/ou aumentando a sua entrega intracelular.

É para ser entendido que se uma composição compreende um constituinte adicional tal como um composto de complemento como aqui definido, cada constituinte da composição não pode ser tem formulado numa única combinação ou composição ou preparação. Dependendo da sua identidade, o técnico especializado conhecerá que tipo de formulação é o mais apropriado para cada constituinte como aqui definido. Numa forma de realização preferida, a invenção fornece uma composição ou uma preparação que é em forma de uma equipe de partes que compreende um oligonucleótido e mais um composto de complemento como depois disso aqui definido.

Um preferido oligonucleótido é para prevenção ou tratamento Duchenne de distrofia Muscular (DMD) ou Becker de distrofia Muscular (BMD) num indivíduo. Um indivíduo, que pode ser tratado usar um oligonucleótido da invenção pode já ter sido diagnosticado como um DMD ou um BMD. Alternativamente, um indivíduo que pode ser tratado usar um oligonucleótido da invenção não pode ter até ter sido diagnosticado um DMD ou um BMD mas pode ser um indivíduo com um risco aumentado de

desenvolvimento de um DMD ou um BMD no futuro pelos seus antecedentes genéticos. Um indivíduo preferido é um ser humano.

Se requerido, uma molécula ou um vetor que expressa um anti sentido oligonucleótido da invenção pode ser incorporada numa mistura farmacologicamente ativa e agregar um suporte farmacologicamente aceitável.

Conseqüentemente, a invenção também fornece uma composição farmacêutica que compreende uma molécula que compreende um anti sentido oligonucleótido de acordo com a invenção, ou um vetor com base num viral que expressa do anti sentido oligonucleótido de acordo com a invenção.

Em um mais aspeto, está provido com uma composição que compreende um oligonucleótido como aqui definido. Preferencialmente, a dita composição compreende pelo menos dois oligonucleotidos diferentes como aqui definido. Mais preferencialmente, estes dois oligonucleótidos diferentes são desenhados para omitir um ou dois ou mais exões. Multi-saltitante é encerrado pela invenção presente, onde um oligonucleótido da invenção que induz o saltitante de exão 44 é usado em combinação com outro oligonucleótido induzindo o saltitante de outro exão. Neste contexto, outro exão pode ser exão 43,45 ou 52. Exão múltiplo saltitante já descrito na EP1619249. O gene DMD é um grande gene, com muitos exões diferentes. Considerar que o gene está localizado no cromossoma X, são principalmente afetados meninos, ainda que meninas podem também ser afetadas pela enfermidade, como eles podem receber um original mau do gene de ambos os pais, ou são sofrimento de uma inativação particularmente inclinada do

alelo funcional devido a um particular inclinado X de inativação do cromossoma nas suas células musculares. A proteína é codificada por uma diversidade de exões (79) sobre uma margem de pelo menos 2.4 Mb. Faltas podem ocorrer com qualquer parte do DMD gene. Saltitante de um exão particular ou exões particulares podem, muito frequentemente, dar por resultado um ARNm reestruturado que codifica num mais curto que normal mas pelo menos a distrofia funcional parcialmente tem proteico. Um problema prático no desenvolvimento de um medicamento baseado em tecnologia saltitante de exão é a diversidade de mutações que pode dar pelo resultado de uma deficiência em proteína de distrofia funcional na célula. Apesar dos feitos de que múltiplas mutações diferentes podem ser corrigidas para pelos saltitantes de um único exão, esta diversidade de mutações, requer a geração de uma série de medicamentos diferentes em quanto que mutações diferentes de diferentes necessidades de exões saltitantes. Uma vantagem de um oligonucleótido ou de uma composição que compreende pelo menos dois diferentes oligonucleótido como depois disso aqui definido ser capaz de indução saltitante de dois ou mais exões, é que mais de um exão saltitante com um único farmacêutico. Esta propriedade não é apenas útil praticamente num número limitado da necessidade de medicamentos ser gerada para tratar muitos diferentes DMD ou particular, severo BMD de mutações. Outra opção agora aberta ao técnico especializado é selecionar proteínas de distrofia reestruturada particularmente funcional e produzir compostos capazes de gerar estas proteínas de distrofia preferida. Tais resultados de final preferido são mais referidos para como fenótipo suave de distrofias.

Numa forma de realização preferida, a dita composição sendo

preferencialmente uma composição farmacêutica a dita composição farmacêutica que compreende um suporte farmacologicamente aceitável, adjuvante, diluente e/ou excipiente. Tal composição farmacêutica pode compreender qualquer suporte farmacologicamente aceitável, enchedor, conservante, adjuvante, solubilizador, diluente e/ou excipiente também é fornecido. Tal suporte farmacologicamente aceitável, enchedor, conservante, adjuvante, solubilizador, diluente e/ou excipiente pode por exemplo encontrado em Remington: a ciência e prática de farmácia, 20th edição. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cada característica da dita composição foi anteriormente aqui definida.

Se diferentes oligonucleótidos são usados, a concentração ou dose definida já aqui pode recorrer da concentração total ou dose de todos os oligonucleótidos terem usado ou a concentração ou a dose de cada oligonucleótido usado ou adicionado. Consequentemente numa forma de realização, está provido uma composição em que cada um ou a quantidade total de oligonucleótido usado é dosificada numa quantidade disposta entre 0.5 mg/kg e 10 mg/kg.

A invenção fornece ainda o uso de um anti sentido oligonucleótido de acordo com a invenção, ou um vetor com base em viral que expressa um anti sentido de oligonucleótido de acordo com a invenção, para modular a junção do DMD ARNM. A junção é preferencialmente modulada num humano miogenico de células ou células musculares invitro. Mais preferido é que a junção é modulada num humano miogenico de células ou células musculares in vivo.

Um anti sentido preferido de oligonucleótido que compreende um ou mais análogos de nucleótido ou equivalentes da invenção modula que empalma num ou mais células musculares, incluindo coração muscular de células, entrega sobre a sistêmica. Neste aspeto, a entrega sistêmica de um anti sentido oligonucleótido que compreende um análogo de nucleótido específico ou equivalente pode dar por resultado uma objetiva um subconjunto de células musculares, enquanto um anti sentido oligonucleótido que compreende um análogo de nucleótido diferente ou equivalente pode ter como resultado objetivo um subconjunto diferente de células musculares. Consequentemente, numa forma de realização preferida para usar uma combinação de oligonucleótidos de anti sentido que compreende análogos de nucleótidos diferentes ou equivalentes para modular saltitantes de exão de 44 do DMD ARNM.

A invenção além disso fornece o uso de um anti sentido oligonucleótido de acordo com a invenção, ou de um vetor com base num viral que expressa o anti sentido oligonucleótido de acordo com a invenção, para a preparação de um medicamento para o tratamento de um DMD ou de um BMD doente.

Consequentemente num outro aspeto, está provido do uso de um oligonucleótido ou de uma composição como definido aqui para a produção de um medicamento para evitar o tratamento Duchenne de distrofia Muscular ou Becker de distrofia Muscular num individuo. Cada característica do dito uso foi anteriormente aqui definida.

Um tratamento no uso ou num método de acordo com a invenção e pelo menos uma semana, pelo menos um mês, pelo menos diferentes meses, pelo menos um ano, pelo menos 2, 3, 4, 5,6

anos ou mais. Cada molécula ou oligonucleótido ou equivalente deste como definido aqui para uso de acordo com a invenção pode ser adequada para administração direta a uma célula, tecido e/ou um órgão in vivo de pessoas afetadas por ou em risco de desenvolvimento de DMD ou de BMD, e pode ser administrado diretamente in vivo, ex. vivo ou invitro. A frequência de administração de uma composição de oligonucleótido, composto ou complemento da invenção pode depender de diferentes parâmetros tais como a era do doente, a mutação do doente, o número de moléculas (isto é dose), a formulação da dita molécula. A frequência pode ser disposta entre pelo menos uma vez em duas semanas, ou três semanas ou quatro semanas ou cinco semanas ou um período de tempo mais largo.

A dose de oligonucleótido varia de acordo com a invenção e são preferencialmente projetadas baseando-se num estudo da dose de aumento em processos clínicos (em vivo uso) para que os requisitos de protocolo rigoroso existam. Uma molécula ou um oligonucleótido como aqui definido pode ser usada numa dose que é disposta entre 0.1 e 20 mg/kg, preferencialmente de 0.5 e 10 mg/kg.

Numa forma de realização preferida, uma concentração de um oligonucleótido como aqui definido, que é disposta entre 0,1 nM e 1 μ M é usado. Preferencialmente, esta margem é para uso invitro num modelo celular tais como células musculares ou tecido muscular. Mais preferencialmente, a concentração usada é disposta entre 0.3 para 400 nM, ainda mais preferencialmente entre 1 para 200 nM. Se diferentes oligonucleotidos são usados, esta concentração ou dose pode recorrer a concentração total ou dose de oligonucléotides ou

a concentração ou dose de cada oligonucleótido adicional. As gamas de concentração ou dose de oligonucleótido (s) como sobre dados são preferidas concentrações ou dosificada para invitro ou ex. vivo usos. O técnico especializado compreenderá que dependendo do oligonucleótido (s) tem usado, a célula diana para ser tratado, o objetivo de gene e seus níveis de expressão, o meio tem usado e as condições de transfusão e incubação, a concentração ou dose de oligonucleótido (s) usado pode variar mais e pode precisar de ser mais otimizado.

Um oligonucleótido como aqui definido para uso de acordo com a invenção pode ser adequado para administração de uma célula, tecido e/ou um órgão in vivo de pessoas afetados por um risco de desenvolvimento DMD ou BMD, e pode ser administrado in vivo, ex. vivo ou invitro. O dito oligonucleótido pode ser direto ou indiretamente administrado a uma célula, tecido e/ou um órgão in vivo de um indivíduo afetado por ou em risco de desenvolvimento de DMD ou de BMD, e pode ser administrado direto ou indiretamente in vivo, ex. vivo ou invitro. Como Duchenne e Becker distrofia muscular têm um fenótipo pronunciado em células musculares, é preferido as ditas células musculares, é mais preferido este tecido é um tecido muscular e/ou é mais preferido do dito órgão que compreende ou consiste num tecido muscular. Um órgão preferido é o coração. Preferencialmente, as ditas células compreendem um gene que codifica uma proteína de distrofia mutante. Preferencialmente, as ditas células são células de um sofrimento individual de DMD ou BMD.

A menos que se indique o contrario cada forma de realização como se descreve neste caso pode ser combinada com outra

forma de realização como se descreve neste caso.

Neste documento e nas suas reivindicações, o verbo "to comprise" e as suas conjugações é usado no sentido não-limitativo para significar que unidades depois da palavra são incluídos, mas as unidades não especificamente mencionadas não são excluídas. Adicionalmente o verbo "to consist" pode ser substituído por significado "to consist essentially of" que um composto de composto ou complemento como aqui definido pode compreender componentes adicionais que aqueles identificados especificamente, o dito adicional componente não alterar a característica original da invenção.

Adicionalmente, a referência a um elemento pelo indefinido artigo "a" ou "an" não exclui a possibilidade que mais de um do elemento é apresentado, salvo se o contexto claramente requer que ali um e apenas um dos elementos. O indefinido artigo "a" ou "an" assim normalmente significa "at least one".

A palavra "approximately" ou "about" quando usados em associação com um valor digital (aproximadamente de 10, aproximadamente 10) preferencialmente significa que o valor pode ser o valor dado de 10 mais ou menos 1% do valor.

A expressão "in vivo" como aqui usado pode significar um sistema celular que pode ser isolada do organismo das células derivas. Células preferidas são células musculares. In vivo pode também significar um tecido ou um organismo multicelular que é preferencialmente um doente como aqui definido. Através de fora da invenção, in vivo é oposto a um invitro que é associado com geralmente uma célula livre do sistema.

Cada forma de realização como aqui identificado pode ser combinada juntamente com um menos que se indique o contrário.

A invenção é subsequentemente explicado nos exemplos seguintes. Estes exemplos não limitam o âmbito da invenção, mas meramente servem para esclarecer a invenção.

As legendas da figura

A avaliação da figura 1. de AONs desenhada para induzir o saltitante de exão 44 do DMD de gene tem modificada células musculares de controlo saudável ou um DMD doente com uma supressão de exão 45.

(A) em células de músculo diferenciado (myotubes) dum doente com uma supressão de exão 45, todos testados (modificada) AONs exão induzido 44 saltitante a uma concentração de 150 nM, com PS188 (SEQ ID NO:5), PS190 (publicado previamente como h44AON2; Aartsma-Rus et al. Neuromuscul Disord 2002,12 Suppl: S71), PS191 (SEQ ID NO: 47), PS193 (SEQ ID NO:48), PS194 (SEQ ID NO:46), e PS196 (SEQ ID NO: 51) que demonstra eficiências de máximo (entre 84% e 94%).

(B) A maioria de AONs foi também testada por transfusão em células de controlo de humano saudável em 150 e 400 nM de concentrações. Os resultados são resumidos neste gráfico de coluna. PS188 (SEQ ID NO:5), PS190; PS191 (SEQ ID NO: 47), PS193 (SEQ ID NO: 48), PS194 (SEQ ID NO: 46), e PS196 (SEQ ID NO: 51) eram confirmadas para ser mais eficazes em induzindo exão 44 saltitantes. Nota que o exão 44 saltitante níveis em células de doente são

habitualmente superiores em células de controlo como resultado do feito de que, uma diferença de células saudáveis, em exão de células de doente 44 saltitante é estruturante-restaurador e estão lá na altura de mais um funcional e estável. Não exão 44 saltitante foi observado em não-modificadas células musculares em todas as experiências (dados não mostrados).

(C) Exemplos de PS197 (SEQ ID NO 52) e três adicionais AONs, PS199 (SEQ ID N° 44), PS200 (SEQ ID N° 49), e PS201 (SEQ ID N° 50), testado de uma forma semelhante em controlo muscular de células, em concentrações de transfusão 150 nM e 400 nM. O exão 44 saltitante cujas percentagens tem variado entre 1% (PS199) e 44% (PS200). M: dimensão de ADN marcador (100 escada de bases).

A Figura 2. Mais avaliação de PS188 (SEQ ID NO:5) por transfusão de controlo de humano muscular células ou sangue periférico mononucleados de células (PB-MNCs).

(A) Dose-resposta de experiência. Em controlo de humano muscular células, PS188 mostrou níveis crescentes de exão 44 saltitantes em aumento de dose de transfusão de 50 nM para 400 nM (em triplo), até 45% em 400 nM.

(B) PB-MNCs de um individuo saudável eram modificadas com 200 nM PS188. Apesar a distrofia de feito de que é apenas expressada em níveis baixos neste tipo de células, o exão 44 saltitante foi claramente observado. Estes resultados confirmam a eficiência de PS188 em induzindo exão 44 saltitantes do DMD gene. M: marcador

de dimensão de ADN.

A Figura 3. Mais avaliação de PS188 (SEQ ID NO:5) por administração para transgênico hDMD ratos que expressam do humano de longitude total do gene de DMD, e para cinamolgos símios têm incluído um estudo de toxicidade extensiva.

(A) injeção intramuscular seguinte de 2x40 µg PS188 em ambos gastrocnémios músculos (G1 e G2) de um hDMD de rato, exão 44 saltitante foi observado, ainda assim em níveis baixos. Este confirma a capacidade de PS188 para induzir o exão de humano 44 saltitante num tecido muscular in vivo. Os níveis baixos eram esperados dados os feitos de que este modelo de rato tem fibras de músculo saudável habitualmente para mostrar níveis inferiores de AON fibras de músculo distrófico comparado com quando de captação. NT: em não tratado de hDMD muscular não exão 44 saltitante foi observado. M: marcador de dimensão de ADN

(B) Em símios têm incluído um estudo de toxicidade em PS188, exão 44 saltitante foi observado em sangue periférico mononucleadas células (PB-MNCs) depois de 1-hora intravenosa infusões cada quarto dia durante 29 dias a um nível de dose de 6mg/kg PS188. Não exão 44 saltitante foi observado em símios não tratados de (NT). M: marcador de dimensão de ADN.

Exemplos

Exemplo 1

Material e métodos

O desenho de AON foi baseado em (parcialmente) estruturas secundárias abertas superpostas do exão do objetivo de ARN como previsto pelo m-pregado programa (Mathewset otros., J Biol de Mol 1999,288(5): 911-40), em (parcialmente) suposto superposto SR-proteínas lugares de união como previsto pelo ESE-ortopédicos software (rulai.cshl.edu/tools/ESE/) (Cartegni et al., ácidos nucleicos Res 2003,31(13): 3568-71), e evitando extensões de g de 3 ou mais nucleótidos ou CpG pares. AONs (ver tabela 1) eram sintetizadas por Eurogentec (Bélgica) e Propensa terapêutica BV (leiden; países Baixos), e contem 2'-O metilo ARN e coluna vertebral de fosforotioato.

Cultivo de tecido, transfusão e análise de RT-PCR

Miotube cultivos derivados dum individuo saudável ("humano) ou um DMD doente com uma supressão de exão 45 eram processados como se descreve previamente (Aartsma-Rus et al. zumbir Mol Genot 2003,12(8): 907-14; Havenga et al. J Virol 2002,76(9): 4612-20)). Para a seleção de AONs, Miotube cultivos eram modificados com 150 e/ou 400 nM de cada AON. Transfusão tem reactivo polietilenimina (PEI, ExGen500 MBI Fermentas) ou um derivado (UNIFectilina, Prosensa terapêutica BV, países Baixos) foi usado, com 2 µl ExGen500 ou UNIFectilina por µg AON. Um controlo AON com uma etiqueta de fluoresceína foi usado para confirmar eficiências de transfusão ótima (habitualmente sobre 90% núcleos fluorescentes eram obtidos). ARN foi isolado 24 para 48 horas depois de transfusão como se descreve (Aartsma-Rus et al. Neuromuscul Disord 2002,12 Suppl: S71). Exão saltitante de eficiências eram determinados por nidificado RT-PCR análise

usando cevadores nos exões flanqueando exão 44 (Aartsma-Rus e al. *Neuromuscul Disord* 2002,12 Suppl: S71). Fragmentos de PCR eram isolados de geles de agarose (usando o QIAquick equipa de extração de Gel (QIAGEN) para verificação de sequência (pelo Leiden tecnologia de genoma centrais (LGTC) usando o BigDye determinação de sequência de ciclo de terminador preparada equipa de reação (PE biosistemas aplicados), e ABI 3700 sequenciador (PE biosistemas aplicados). Para quantificação, os produtos PCR eram analisados usando o ADN 1000 LabChips equipa no Agilent 2100 bio desativadores (Agilent tecnologias, USA).

Resultados

Uma série de AONs sequenciais objetivos dentro do exão 44 eram projetados e testados em controlo saudável e derivado com doente Miotube cultivados, por transfusão e posterior RT-PCR e análise de sequências de isolado ARN. Em miotubes derivados dum DMD doente com uma supressão de exão 45, exão específico 44 saltitante foi induzido em 150 nM para cada AON (PS187 para PS201) testado, com PS188 (SEQ ID:5), PS190 (publicado previamente como h44AON2, Aartsma-Rus et al. *Neuromuscul Disord* 2002,12 Suppl: S71), PS191 (SEQ ID N°: 47), PS193 (SEQ ID N°: 48), PS194 (SEQ ID N°: 46), e PS196 (SEQ ID NO: 51) que demonstra níveis de saltitante máximo (entre 84% e 94% em 150 nM) (Fig.1A)).

Experiências de transfusões similares eram feitas em células de controlo de um saudável indivíduo. Percentagens de exão 44 saltitantes eram constatadas e comparadas com estes nos cultivos de células de doente (Fig. 1B). Inerente a mediado sem sentido ARN decadência da cópia de controlo depois de

exão 44 tem saltitantes, as percentagens de controlo eram habitualmente baixar que estas nas células de doente (vem por exemplo resultados com PS197 em fig. 1A (células de doente) vs. Fig. 1C (controlo células)).

Três adicionais AONs (PS 199 (SEQ ID N° 44), PS200 (SEQ ID N° 49), e PS201 (SEQ ID N° 50) eram testadas em controlo de células musculares, em concentrações de 150 nM e 400 nM. O exão 44 saltitante de percentagens tem variado entre 1% (PS199) e 44% (PS200) (Fig. 1C). Baseado em todas as experiências de transfusão, os AONs PS187; PS188; PS190; PS191; PS192; PS193; PS194; PS196 e PS200 eram considerados mais eficazes, e os AONs PS189; PS197; PS198; PS199, e PS201 menor eficazes.

PS188 (SEQ ID N° 5) foi mais testada em experiências de resposta de dose em células de controlo de humano saudável muscular, aplicação crescente de dose de 50 para 400 nM em triplo. Níveis crescentes de exão 44 saltitantes eram consequentemente observados, até 45% em 400 nMPS188 (figura 2A).

Exemplo 2

Materiais e métodos

Uma amostra de sangue de controlo de humano saudável fresco, recolhido num tubo de EDTA, foi estratificada sobre um HistoPaque gradiente. Sobre a centrifugação, as segundas camadas (do quatro camadas, embaixo) com as células mononucleadas foram recolhidas, lavados, e centrifugados novamente. O granulado de célula foi re suspendido em meio de

cultivo de proliferação e contada. Numa placa de 6-poços, 8×10^6 as células por bem eram chapadas e incubado em 37°C , 5% CO_2 durante 3 horas. As células eram logo modificadas com 0 ou 200 nM PS188 (SEQ ID NO:5,2'OMePS ARN; Prosensa terapêutica BV), em duplo, por prato. ARN foi isolado 72 horas depois da transfusão, e analisado por RT-PCR análise usando DMD - genes específicos flanqueando exão 44 (Aartsma-Rus et al. Neuromuscul Disord 2002,12 Suppl: S71). Análise de sequências (pelo Leiden tecnologia de genoma central (LGTC) usando o BigDye determinação de sequência de ciclo de terminador preparada equipe de reação (PE biosistemas aplicados), e ABI 3700 sequenciador (PE biosistemas aplicados) foi realizado em produtos PCR isolados (usando o QIAquick equipe de extração de Gel (QIAGEN) para confirmar o exão específico 44 saltitante em ARN nível.

Resultados

Em modificado sangue periférica tem mononucleados células (PB-MNCs) dum controlo saudável tem indivíduos, PS188 induzido a produção de um fragmento de cópia mais curta nova aplicado quando em 200 nM (Fig. 2B). Este fragmento foi isolado num ordenado e confirmado devido ao específico saltitante de exão 44. Em não-modificada PB-MNCs não exão 44 saltitante foi observado. Estes resultados indicam que PS188 é um composto eficaz que induz exão de humano 44 saltitante invitro.

Exemplo 3

Materiais e métodos

Anti sentido oligo-ribonucleotidos (AONs).

Normal e mdx ratos (Sicinski et al. (1989). *Ciência* 244: 1578-1580) eram injetados com o específico de rato m46AON4 (caminhonete Deutekom et al. (2001) *zumbem Mol Genot* 10: 1547-1554), considerando que o hDMD de ratos com o específico de humano PS196 (SEQ ID N° 51) ou PS188 (SEQ ID N° 5). Ambos os AONs têm contido uma espinha dorsal de fosforotioato de corpo saibo e 2'-O-metilo moléculas de ribose modificada (PS196: Eurogentec, Bélgica; PS188: Prosensa terapéutica BV).

Normal, mdx e transgênico de hDMD de ratos

Ratos Normais (C57Bl/6NCrL) e mdx ratos (C57Bl/10ScSn-mdx/J) eram obtidos de Carlos conca de rio laboratórios (o países Baixos). Transgênico hDMD de ratos eram projetados em nosso próprio LUMC laboratórios. Brevemente, até embrionária (ES) células eram modificadas geneticamente através de fusões com esferoblastos de levedura de suporte de um YAC de 2.7 Mb que contidas o de corpo saibo (2.4 Mb) humano DMD gene. Este YAC foi previamente reconstruído por recombinação homóloga de superposto menor YACs em levedura (toca Dunnen et al. (1992). *Zumbir Mol Genot* 1: 19-28)). ES-células que mostra integração de uma cópia da dimensão completa YAC, como constatado por PFGE aplicação, análise de PCR de exão um contratempo o gene inteiro, e análise de peixe de metáfase, eram logo usados para causar homozigoto hDMD de ratos ('t Hoen et al., *J. Biol. Chem.* 2008)). Transgênico hDMD de ratos não parecem ser fisicamente afetados pela modificação genética. A expressão apropriada do humano DMD gene poderia ser demonstrada em músculo, ambos em ARN e nível proteico. A engenharia destes ratos foi autorizada pelo ministério holandês de agricultura

(LNV); projeto nr. WA/BD01.284 (E21).

Administração de AONs.

As experiências em intramuscular AON-injeções em ratos eram autorizadas pelo animal experimentais comissão (UDEEC) da faculdade médica do leiden universidade (projeto não 00095,03027). Os AONs eram injetados, qualquer puros, ou complexos à polietilenimina de polímero catiónico (PEI; ExGen 500 (20x), MBI Fermentas) em rácios de 1 ml PEI por nmol AON em 5% de solução de glicose de p/v, ou para 15 nmol SAINT-18TM (Synvolux terapéutica B.V., o países Baixos), de acordo com as instruções dos fabricantes. O SAINT-18TM sistema de entrega se encaixa num grupo de cabeça de piridínio catiónico e permite entrega não-tóxica de oligonucléotides de anti sentido. Ratos eram anestesiados por injeção intraperitoneal de um 1:1 (v/v) Hypnorm/Dormicum solução (Janssen Pharmaceutica, Belgium/Roche, o países Baixos). Puro AON (PS188) foi administrado num volume de injeção final de 40 µl por injeção intramuscular em ambos gastrocnémios músculos dos ratos usar um Hamilton seringa com um 22-Gauge agulha. Os ratos receberam duas injeções de 40 µg a 24h de intervalo. Eles eram sacrificados em post-injeção de pontos de tempo diferentes; para PS188-injected hDMD de ratos dez dias depois da injeção de última. Músculos eram isolados e congelados em líquido arrefecido com nitrogénio 2- metilbutano.

RT-PCR análise.

Amostras musculares eram homogeneizadas em solução de abelha de ARN (Campo científicas, o países Baixos). ARN total foi isolado e purificado de acordo com as instruções do

fabricante. Para ADNc síntese com a transcriptase reversa C. polipolimerase de unidade de calor ou Transcriptor (Roche diagnostica, o países Baixos), 300 ng de ARN foi usada em um 20 µl de reação em 60°C durante 30 min, reverso cevado com qualquer rato- ou cevadores específicos de humano. Primeiro PCRs eram realizados com conjuntos de cevador externo (exões flanqueantes 43-45 para PS188-injected ratos), durante 20 ciclos de 94°C (40 seg.), 60°C (40 seg.), e 72°C (60 seg.). Um µl desta reação (diluído 1:10) foi logo re - amplificado usando combinações de cevador nidificado nos exões diretamente flanquear o exão de objetivo (exão 44 para PS188-injected ratos), com 30 ciclos de 94°C (40 seg.), 60°C (40 seg.), e 72°C (60 seg.). Produtos PCR eram analisados em 2% geles de agarose. Eficiências saltitantes eram determinadas por quantificação de produtos PCR usando o equipe de LabChip® de ADN 1000 e o Agilent 2100 biodesativadores (Agilent tecnologias, o países Baixos). Conjuntos de cevador e sequências eram descritos previamente (Aartsma-Rus et al. (2002) Neuromuscul Disord 12 Suppl: S71,8,17; caminhonete Deutekom et al. (2001) zumbem Mol Genot 10: 1547-1554).

Análise de sequências.

RT-PCR produtos eram isolados de 2% geles de agarose usando o QIAquicc equipe de extração de Gel (QIAGEN). Sequenciação de ADN direta efetuou-se pelo leiden da tecnologia de genoma central (LGTC) usando o BigDye determinação de sequência de ciclo de terminador preparada a equipe de reação (PE biossistemas aplicados), e analisado num ABI 3700 sequenciador (PE biossistemas aplicados).

MALDI-TOF espectrometria de massa.

Abelha de ARN muscular de tecidos homogeneizados eram purificados usando uma equipe de purificação de ácido nucleico (equipe de purificação de ácido nucleico para Sequazyme™ ponto SNP equipa, biosistemas aplicados) com 96 bem placas de giro (biosistemas aplicados) depois as instruções do fabricante. Solução de matriz (50 mg/ml 3-hidróxi picolinico ácido e 25 mM citrato de amônio dibásico em 50% acetonitrilo) foi aplicada em 1 ml partes alíquotas para um AnchorChip™ objetivo de amostra (Bruker Daltonics, Alemanha) e ar seco. Amostras eram manchadas em 0.5 ml partes alíquotas sobre os cristais de matriz e ar seco. Determinações de massa eram realizadas num reflexo III MALDI-TOF espectrómetro de massa (Bruker Daltonics, Alemanha). Espectros eram adquiridos em modo de refletor e acumulados para aproximadamente 900 disparos de laser. Amostras de etiquetado e não-etiquetadas m46AON4 eram analisadas para comparação.

Resultados

Exão saltitante em músculo tipo selvagem

Nós primeira série apontada sobre exão saltitante em músculo de rato in vivo e parâmetros diferentes otimizados de administração. Experiências iniciais eram realizados em ratos de tipo selvagem, e, mediado sem sentido enquanto ARN decadência causará subavaliação do exão saltitante eficiências, o efeito do AONs foi controlado em nível ARNM apenas. Nós temos injetado dosagens crescentes de 0.9 nmol para 5.4 nmol de cada anti sentido oligonucleótido. RT-PCR análise de músculo total ARN demonstrada a ocorrência de um fragmento de cópia mais curta nova em todas as amostras

injetadas. Análise de sequências confirmadas o saltitante de exão 44 neste produto (dados não mostrados).

Secções cruzadas do lateral ao contrário de músculos injetados eram analisados para dispersão e persistência de um controlo etiquetado com fluoresceína AON. Injeção seguinte de puro AON, nós observamos sinais fluorescentes dentro de algumas fibras para até uma semana. Depois disso sinais débeis de pontos de tempo eram observados, e principalmente dentro dos espaços intersticiais. O uso de PEI realçado claramente ambas dispersão e persistência do sinal fluorescente, mesmo depois de 3 semanas. No entanto, a degeneração de fibra também induzida e infiltração de monócito absorvente mais fluorescência. Usar, a maior parte do sinal foi detetado nos espaços intersticiais para até uma semana, indicando que este reactivo fez não eficientemente abrir para o AON nas fibras musculares. Uma vez que o sinal fluorescente não pode assemelhar à presença de intato e funcional AONs, nós temos realizado MALDI-TOF espectrometria de massa tem injetado amostras musculares. As análises indicadas que a etiqueta fluorescente foi removida do AON dentro de 24 horas. O etiquetado AON foi apenas detetável para até duas semanas ao usar-se PEI. O intersticial de AONs eram provavelmente mais vulneráveis para a degradação do que o intracelular de AONs. O não-etiquetado AON foi observado para três e para quatro post-injeção de semanas em todos as três séries, mas pode apenas ser presente o funcional quando intracelular mente, por exemplo na série de PEI.

Exão específico de humano saltitante em hDMD músculo

Uma vez que a estratégia do exão saltitante é uma abordagem

terapêutica específica de sequência, a validação pré-clínica ideal seria um humano de objetivo DMD gene, num rato experimental de antecedentes. Nós temos projetados tais transgênicos, "humanised" DMD (hDMD) de ratos de suporte de uma cópia funcional e integrada do humano do corpo saíbo DMD gene. Expressão de distrofia de humano em hDMD músculo de rato foi especificamente detetado por imunohistoquímico análise de secções cruzadas, usando um anticorpo específico de humano (MANDYS106). Em músculo ARN nível, RT-PCR análise usando qualquer rato- ou transcrição correta têm demonstrado cevadores específicos de humano do gene DMD. Além disso, sobre cruzamento com mdx ratos, o hDMD construção mostrou para complemento o defeito distrófico, como foi constatado por histológico e ADNC análise de micro conjunto ('t Hoen et al., J. Biol. Chem. 2008)). hDMD ratos têm fibras de músculo saudável habitualmente expõem uma captação limitada de despidos de AONs. Nós temos injetado o específico de humano AON PS196 (SEQ ID N° 51) tem complexo para PEI, ou PS188 (SEQ ID N° 5) sem PEI, no gastrocnémios músculos do hDMD de ratos (2x40 µg injeções dentro 24 horas). Em 7 para 10 dias post-injeção nós claramente observamos o saltitante do exão apontado 44 do humano DMD cópia (Fig. 3A). Ainda o específico de humano AONs são altamente homólogos nas sequências de rato correspondente, com apenas 2 ou 3 desadaptações no respetivo 20-mers, no rato endógeno as transcrições eram não afetadas para qualquer nível detetável. PS188 exão induzido 44 tem saltitante, como confirmado por análise de sequências. Não exão 44 saltitante foi observado em não tratada hDMD músculo. Estes resultados indicam que PS188 é um composto eficaz que induz exão de humano 44 saltitante em tecido muscular.

Exemplo 4

Material e métodos

Como parte de um programa de toxicidade extensiva para PS188, não-jejudo cinamolgos símios eram tratados por 1-hora intravenosa infusão (5 mL/kg / h) cada quarto dia durante 29 dias numa dose- nível de 6mg/kg PS188 (SEQ ID N° 5,2'OMePS ARN; Agilent ciências de vida, USA). As PS188 formulações eram preparadas em cada dia de tratamento (em dias de teste 1, 5, 9, 13, 17, 21,25 e 29) logo antes da iniciação da administração (logo como possível antes, um ou mais dentro uma hora antes iniciação de administração). Formulações eram preparadas para dissolução PS188 em tampão fosfato; o conteúdo de pureza e água eram tomados em conta como fornecidos no certificado de análise da substância do medicamento. A quantidade de PS188 foi ajustada para cada peso corporal de corrente do animal. Os animais eram sacrificados 96 horas depois da administração da última (dia 33). Amostras de sangue (10 ml) eram recolhidas em tubos de EDTA, e (depois durante a meia-noite à temperatura ambiente de embarque) estratificado sobre um HistoPaque gradiente. Sobre a centrifugação, a segunda camada (de quatro camadas, em baixo) com as células mononucleadas foram recolhidas, lavadas, e centrifugadas novamente. ARN foi isolado do granulado de célula resultante e analisado por RT-PCR análise usando DMD-geno cevadores específicos flanqueando exão 44 (Aartsma-Rus et al. Neuromuscul Disord 2002,12 Suppl: S71). Análise de sequências (pelo leiden tecnologia de genoma central (LGTC) usando o BigDye determinação de sequência de ciclo de terminador preparada a equipa de reação (PE biosistemas aplicados), e ABI 3700 sequenciador (PE biosistemas aplicados) foi realizado em produtos PCR isolados (usando o QIAquicc equipa de extração de Gel

(QIAGEN) para confirmar o exão específico 44 saltitante em ARN nível.

Resultados

Em símios tratados por 1-hora com infusões intravenosas cada quarto dia durante 29 dias num nível de dose de 6mg/kg PS188, exão 44 saltitante foi observado em sangue periférico mononucleada de células (Fig. 3B), apesar do feito de que estas células expressam níveis apenas baixo da distrofia. O humano e mono DMD de sequência apontado por PS188 é de fato 100% idêntico. Não exão 44 saltitante foi observado em símios não tratados. Estes resultados indicam que PS188 é um composto eficaz que induz exão 44 saltitante in vivo.

Sequências oligonucleotidos de anti sentido da tabela 1.

TABELA 1A

| | | |
|-----------|--------------------------|--------------|
| 1 (PS188) | UCAGCUUCUGUUAGCCACUG | SEQ ID NO 5 |
| 2 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACU | SEQ ID NO 6 |
| 3 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUG | SEQ ID NO 7 |
| 4 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA | SEQ ID NO 8 |
| 5 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA | SEQ ID NO 9 |
| 6 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA | SEQ ID NO 10 |
| 7 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA | SEQ ID NO 11 |
| 8 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU | SEQ ID NO 12 |
| 9 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU | SEQ ID NO 13 |
| 10 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEQ ID NO 14 |
| 11 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEQ ID NO 15 |

| | | |
|-------------|-----------------------------|--------------|
| 12 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA | SEQ ID NO 16 |
| 13 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUA | SEQ ID NO 17 |
| 14 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEQ ID NO 18 |
| 15 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEQ ID NO 19 |
| 16 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA | SEQ ID NO 20 |
| 17 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA | SEQ ID NO 21 |
| 18 | CAGCUUCUGUUAGCCACUG | SEQ ID NO 22 |
| 19 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAU | SEQ ID NO 23 |
| 20 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEQ ID NO 24 |
| 21 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEQ ID NO 25 |
| 22 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA | SEQ ID NO 26 |
| 23 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA | SEQ ID NO 27 |
| 24 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEQ ID NO 28 |
| 25 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEQ ID NO 29 |
| 26 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA | SEQ ID NO 30 |
| 27 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA | SEQ ID NO 31 |
| 28 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA | SEQ ID NO 32 |
| 29 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAU | SEQ ID NO 33 |
| 30 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEQ ID NO 34 |
| 31 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEQ ID NO 35 |
| 32 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUUA | SEQ ID NO 36 |
| 33 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA | SEQ ID NO 37 |
| 34 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEQ ID NO 38 |
| 35 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEQ ID NO 39 |
| 36 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA | SEQ ID NO 40 |
| 37 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA | SEQ ID NO 41 |
| 38 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA | SEQ ID NO 42 |
| 39 (PS 192) | CCAUUUGUAUUUAGCAUGUUCCC | SEQ ID NO 43 |
| 40 (PS 199) | AGAUACCAUUUGUAUUUAGC | SEQ ID NO 44 |
| 41 (PS 187) | GCCAUUUCUCAACAGAUCU | SEQ ID NO 45 |
| 42 (PS 194) | GCCAUUUCUCAACAGAUCUGUCA | SEQ ID NO 46 |
| 43 (PS 191) | AUUCUCAGGAAUUUGUGUCUUUC | SEQ ID NO 47 |
| 44 (PS 193) | UCUCAGGAAUUUGUGUCUUUC | SEQ ID NO 48 |
| 45 (PS 200) | GUUCAGCUUCUGUUAGCC | SEQ ID NO 49 |
| 46 (PS 201) | CUGAUUAAAUAUCUUUAU C | SEQ ID NO 50 |

TABELA 1B

| | | |
|-------------|-----------------------|--------------|
| 47 (PS196) | GCCGCCAUUUCUCAACAG | SEQ ID NO 51 |
| 48 (PS 197) | GUAUUUAGCAUGUCCCA | SEQ ID NO 52 |
| 49 (PS 198) | CAGGAAUUUGUGUCUUUC | SEQ ID NO 53 |
| 50 (PS189) | UCUGUUAGCCACUGAUUAAAU | SEQ ID NO 54 |

SEQ ID NO:55 HOMO SAPIENS sequência de aminoácidos DMD

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTG
QKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNICSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQ
VKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSRPLD
FDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYTSLFQVLPQQ
VSIEAIQEVEMLRPPPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQ
AAYVTTSDPTRSPFFSQHLEAPEDKSGSSLMSEVNLDRYQTAL EEVLSWLLSAEDTLQA
QGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSSEDEETEVEQEM
NLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNGKLELNDWLTKTEERTKMEEEPLGPD
EDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQKVLGDRWAN
ICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQK
LAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKNKSVTKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKS
TAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTRQILVKAHQEELPPPPQKKRQITVDSEIRKLS
DVIDTELHSWITRSEAVLQSPFAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKA EKFRKLQDASRSAQA
LVEQM VNEG VNA SIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIAFYNQLEQMT
TTAENWLKIQTTPSEPTA KSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGGPMLDA
DFVAFNHFQVFSQVAREKELQTFDITLPPMR YQETMSAIRTWVQQSETKLSIPQLSVT
DYEIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEGRWKK
LSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHITLKKWMAEVDVFLKEEWPALG DSEILKKQLKQC
RLLVSDIQTIPSLNSVNEGGQKIKNEAEPFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEAL
KGGLEKT VSLQKDLSEMH EWMTQAEEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKE
AKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELET/ITNYQWLCRNLNGKCKTLEEVWACWHEL
LSYLEKANKWLNVEVEFKLKTENIPGAAEISEVLDLENLMRHS EDNPNQIRILAQITLD
GGVMDLINEELETFN SRWRELHEAVRRQKLEEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLA
AYIADKVDAAMPQEAQKIQSDLT SHEISLEEMKKNQCKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDV
SMKFR LFQKPANFEQRLQESKMILDEVKMHLPAL ETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSE
VKSEVEMVIKTGRQIVQKKQTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLKLSR
KMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITE
VGEALKTVLGKKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAE EWLNL LLEYQKHMETFQNV D HITK
WIIQADITLLESEK KKPQKEDVLKRLKAELNDIRPKVDS TRDQAANLMANRGDHC RKLV
EPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFN SDIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKD
MNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNAL KD LRSQRRRKALEIS
HQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQA EGL
SEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTE DMPLEISYVP
STYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEE SLKNIKDSLQSSGRIDIH SKKT
AALQSATPVERV KLQEALSQ LDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQW
LTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQT VVR TLNATGEEHQSSKTDASIL

QEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGK
EQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLGKQTNLQWI
KVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFD
VQETEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLQELRAKQP
DLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLS
LLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMHIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEART
IITDRIERIQQWDEVQEHLQNRQQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKE
GPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVMITENINAS
WRSIHKRVSERAALAEETHRLLQQFPLDLEKFLAWL/TEAETTANVLQDATRKERLLEDSKG
VKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLNEDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSL
RKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDLSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHR
AFKRELKTKPEVIMSTLETVRIFL/TEQPLEGLEKLYQEPRELPPERAQNVTRLLRQAEV
NTEWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRAEVIKGSWQPVGDLLIDSL
QDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLQVAVE
DRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPKNVPYYINHETQTT/CWDHPKMTELY
QSLADLNNVRFSAVRTAMKLRRLQKALCLDLSL/SAACDALDQHNLKQNDQPM/DILQIINC
LTTYDRLEQEHNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDK
YRYL/FFKQVASTGFCDQRRLLGLLLHDSIQIPRQLCEVASFGGSNIEPSVRS/CFQFANNKPEIE
AALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAQHAKCNICKECPIGFRYRSLKHFNYDIOQ
SCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFR/TKRYFAKHPRMGYLPV
QTVLEGDNMETPVT/LINFVPVDSAPASSPQLSHDD/THSRIEHYASRLAEMENSNGSYLND
ISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESE/ERGELELERILADLEEENRNLQ
AEYDRLKQ/QHEHKGLSPLSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQH/KGRLEARMQILED
HNKQLESQ/LHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRV/VGSGTSDSMGE
EDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

Lisboa, 25 de Novembro 2015

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo Titular tem como único objectivo ajudar o leitor e não forma parte do documento de patente europeia. Ainda que na sua elaboração se tenha tido o máximo cuidado, não se podem excluir erros ou omissões e a EPO não assume qualquer responsabilidade a este respeito.

Documentos de Pedidos de Patente citadas na descrição

NL 01000697 W

US 6875736 B

EP 1619249 A

Literatura que não é patente citada na descrição

- **VAN DEUTEKOM ; VAN OMMEN.** *Nat. Rev. Genet.*, 2003, vol. 4 (10), 774-83 [0004]
- **AARTSMA-RUS ; VAN OMMEN.** *RNA*, 2007, vol. 13 (10), 1609-24 [0004]
- **FRIESEN ; DARBY.** *Nature Structural Biology*, 1998, vol. 5, 543-546 [0013]
- **DORN ; KIPPENBERGER.** *Curr Opin Mol Ther*, 2008, vol. 10 (1), 10-20 [0015]
- **CHENG ; VAN DYKE.** *Gene*, 15 September 1997, vol. 197 (1-2), 253-60 [0016]
- **AARTSMA-RUS A et al.** Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve*, 2006, vol. 34, 135-144 [0026]
- **MANZUR AY et al.** Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. Wiley publishers, 2008 [0035]
- **HODGETTS S. et al.** *Neuromuscular Disorders*, 2006, vol. 16, 591-602 [0035]
- **ALTER J et al.** Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression body-wide and improves dystrophic pathology. *Nat Med*, 2006, vol. 12 (2), 175-7 [0038]
- **LU QL et al.** Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med*, 2003, vol. 6, 6 [0038]
- **LU QL et al.** Systemic delivery of antisense oligonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, vol. 102 (1), 198-203 [0038]
- **MANN CJ et al.** Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *J Gene Med*, 2002, vol. 4 (6), 644-54 [0038]
- **GRAHAM IR et al.** Towards a therapeutic inhibition of dystrophin exon 23 splicing in mdx mouse muscle induced by antisense oligoribonucleotides (splicomers): target sequence optimisation using oligonucleotide arrays. *J Gene Med*, 2004, vol. 6 (10), 1149-58 [0038]
- **NIELSEN et al.** *Science*, 1991, vol. 254, 1497-1500 [0059]
- **GOVINDARAJU ; KUMAR.** *Chem. Commun*, 2005, 495-497 [0059]
- **EGHOLM et al.** *Nature*, 1993, vol. 365, 566-568 [0059]
- **MORITA et al.** *Nucleic Acid Res*, 2001, 241-242 [0062]
- **GOYENVALLE A et al.** Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*, 2004, vol. 306 (5702), 1796-9 [0070]
- **DE ANGELIS FG et al.** Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, vol. 99 (14), 9456-61 [0070]
- **DENTI MA et al.** Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum Gene Ther*, 2006, vol. 17 (5), 565-74 [0070]
- **GORMAN L et al.** Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, vol. 95 (9), 4929-34 [0070]
- **SUTER D et al.** Double-target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta-thalassemic mutations. *Hum Mol Genet*, 1999, vol. 8 (13), 2415-23 [0070]
- **REMYINGTON.** *The Science and Practice of Pharmacy*. Lippincott-Williams & Wilkins, 2000 [0086]
- **MATHEWS et al.** *J Mol Biol*, 1999, vol. 288 (5), 911-40 [0104]
- **CARTEGNI et al.** *Nucleic Acids Res*, 2003, vol. 31 (13), 3568-71 [0104]
- **AARTSMA-RUS et al.** *Hum Mol Genet*, 2003, vol. 12 (8), 907-14 [0105]
- **HAVENGA et al.** *J Virol*, 2002, vol. 76 (9), 4612-20 [0105]
- **SICINSKI et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 1578-1580 [0112]
- **VAN DEUTEKOM et al.** *Hum Mol Genet*, 2001, vol. 10, 1547-1554 [0112] [0115]
- **DEN DUNNEN et al.** *Hum Mol Genet*, 1992, vol. 1, 19-28 [0113]
- **T HOEN et al.** *J. Biol. Chem.*, 2008 [0113] [0120]
- **AARTSMA-RUS et al.** *Neuromuscul. Disord*, 2002, vol. 12, S71.8, , 17 [0115]

Reivindicações

1. Um anti sentido oligonucleótido consistente em a sequência de 5' UCAGCUUCUGUUAGCCACUG 3' (bilhete de sequência NO:5).
2. Um oligonucleótido de acordo com a reivindicação 1, que é um fosforodiamidato oligómero de morfolino (PMO), um ácido nucleico peptídico (PNA) ou um ácido nucleico bloqueado (LNA).
3. Um oligonucleótido de acordo com a reivindicação 1, onde dito oligonucleótido é um fosforotioato de metilo de 2'-O oligo-ribonucleotidos.
4. Um vetor com base em viral, que compreende um Pol promotor -III conduzido cassete de expressão, expressar um oligonucleótido como definido na reivindicação 1.
5. Uma composição farmacêutica que compreende um oligonucleótido como definido com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou o vetor da reivindicação 4, e um suporte aceitável farmacêutico.
6. Uso do oligonucleótido como definido com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou o vetor da reivindicação 4, ou a composição segundo a reivindicação farmacêutica 5 para junção da modulação invitro do pré-ARNM de distrofia.
7. Um oligonucleótido como definido com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou o vetor da reivindicação 4, ou a composição segundo a reivindicação farmacêutica 5 para uso como um medicamento para tratar um DMD ou BMD de doente.

8. Um método invitro para induzir um saltitante de exão 44 do pré-ARNM de distrofia numa célula, o método que compreende o fornecimento da dita célula com um oligonucleótido como definido com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou o vetor da reivindicação 4, ou a composição segundo a reivindicação farmacêutica 5.

Lisboa, 25 de Novembro de 2015

Resumo

A invenção proporciona um método para modular salto do gene da distrofia muscular de duchenne (DMD), numa célula. Mais especificamente, o invento proporciona métodos e meios para modular a falha do exão 44 da DMD. A invenção proporciona ainda moléculas de ácido nucleico que podem ser utilizadas para um método da invenção, métodos de expressão para a expressão de uma molécula de ácido nucleico numa célula, e a utilização de uma molécula de ácido nucleico para modular salto de DMD numa célula.

Figura 1

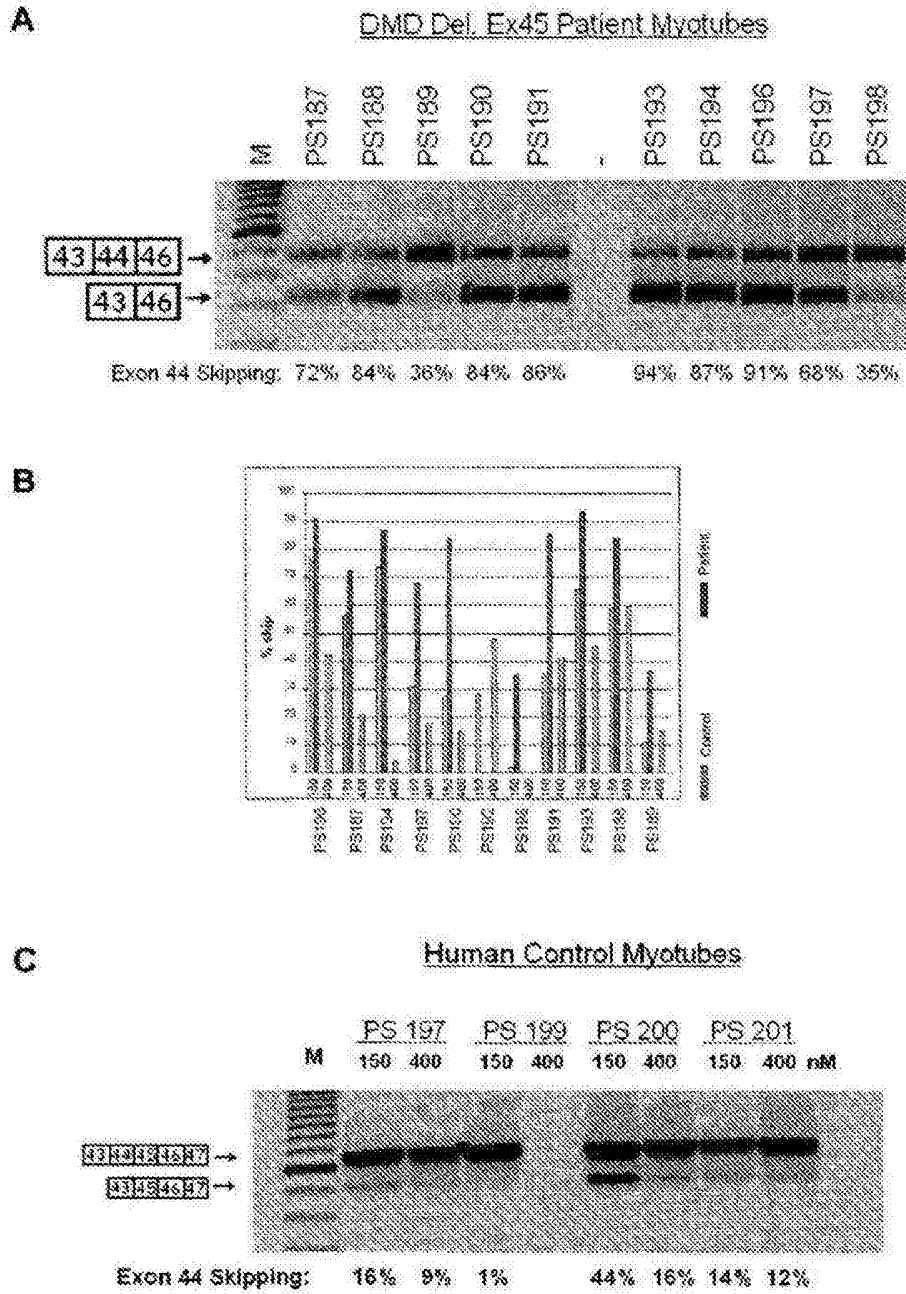


Figura 2

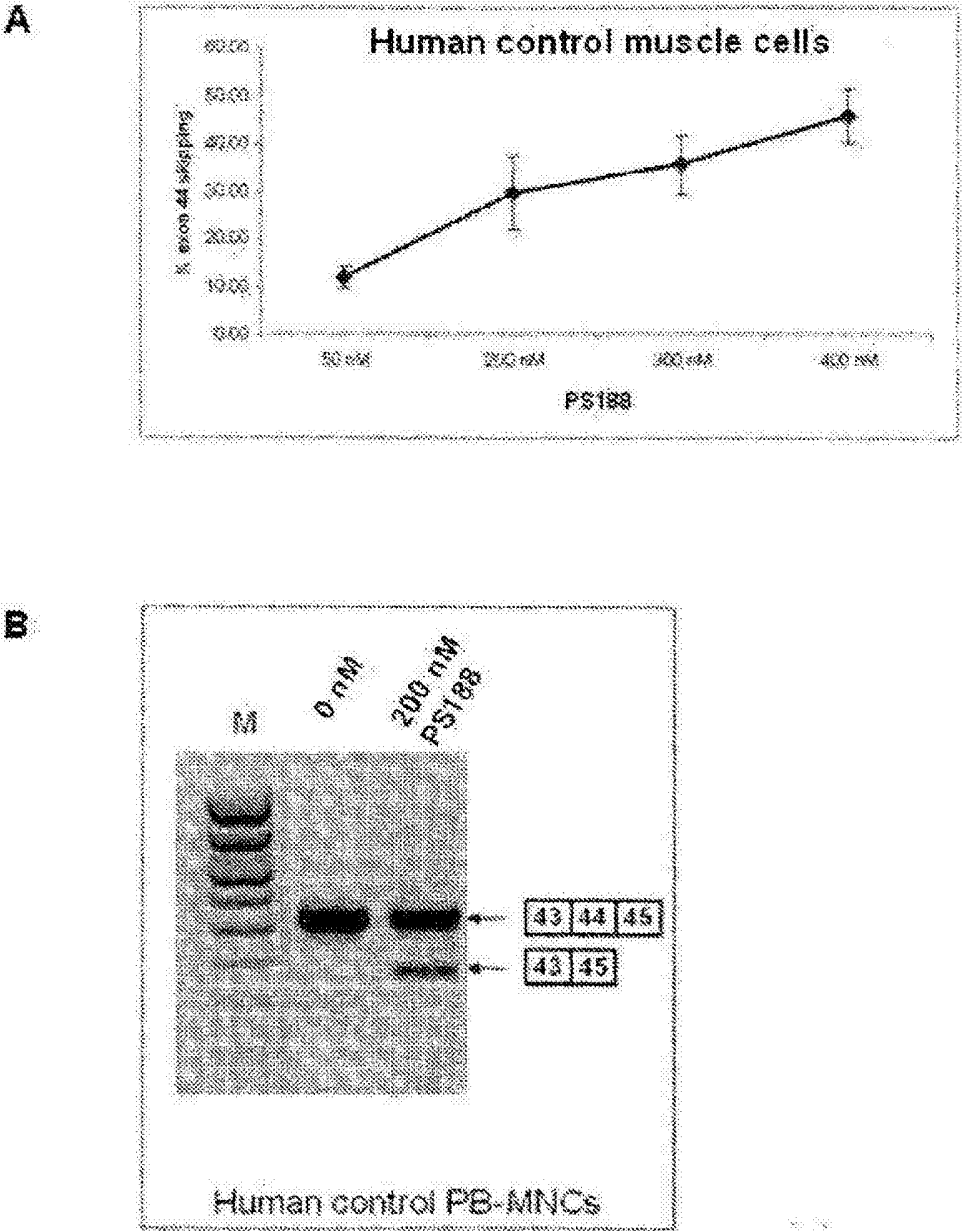


Figura 3

