

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 246**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07808532 .1**
96 Fecha de presentación: **10.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2049664**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **OLIGONUCLEÓTIDOS MONOCATENARIOS COMPLEMENTARIOS DE ELEMENTOS REPETITIVOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS GENÉTICOS ASOCIADOS A LA INESTABILIDAD DE REPETICIONES DE ADN.**

30 Prioridad:
11.08.2006 EP 06118809
21.08.2006 EP 06119247

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2012

73 Titular/es:
PROSENSA TECHNOLOGIES B.V.
EINSTEINWEG 55
2333 CC LEIDEN, NL

72 Inventor/es:
DE KIMPE, Josephus Johannes;
PLATENBURG, Gerardus Johannes y
WANSINK, Derick Gert

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 373 246 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos monocatenarios complementarios de elementos repetitivos para el tratamiento de trastornos genéticos asociados a la inestabilidad de repeticiones de ADN

5 [0001] La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular al tratamiento de trastornos genéticos asociados a genes que tienen repeticiones inestables en sus secuencias codificantes o no codificantes, más en particular, repeticiones inestables en la enfermedad humana de Huntington causada por el gen HD, o distrofia miotónica tipo 1 causada por el gen DMPK.

10 [0002] Inestabilidad de microsatélite específico de gen y secuencias repetitivas de minisatélite, que conducen a un aumento en la longitud de las secuencias repetitivas en el satélite, se asocian a alrededor de 35 trastornos genéticos humanos. La inestabilidad de repeticiones de trinucleótido se encuentra, por ejemplo, en genes causantes de atrofia muscular espinobulbar ligada al cromosoma X, distrofia miotónica tipo 1 (DM1), síndrome X frágil (genes FRAX A, E, F), enfermedad de Huntington (HD) y diferentes ataxias espinocerebelares (familia del gen SCA). Las repeticiones inestables se encuentran en las regiones de codificación de los genes, como el gen de la enfermedad de Huntington, en la que el fenotipo del trastorno es causado por la alteración de la función de las proteínas y/o por el plegamiento de las proteínas. Las unidades de repetición inestables también se encuentran en regiones no traducidas, como en la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) en el 3' UTR, o en secuencias intrónicas, como en la distrofia miotónica tipo 2 (DM2).

El número normal de repeticiones es alrededor de 5 a 37 para DMPK, pero aumenta para premutación y estado completo de la enfermedad de dos a diez pliegues o más, para 50, 100 y a veces 1000 o más unidades de repetición.

20 Para DM2/ZNF9 se ha informado que aumenta a 10,000 o más repeticiones (Cleary y Pearson, *Cytogenet. Genome Res.* 100: 25-55, 2003).

25 [0003] El gen causativo de la enfermedad de Huntington, HD, se localiza en el cromosoma 4. La enfermedad de Huntington se hereda de manera autosómica dominante. Cuando el gen tiene más de 35 repeticiones de trinucleótido CAG que codifican una extensión de poliglutamina, el número de repeticiones puede ampliarse en generaciones sucesivas. Debido al aumento progresivo en la longitud de las repeticiones, la gravedad de la enfermedad tiende a aumentar y se presenta a una edad anterior en generaciones sucesivas, un proceso llamado anticipación. El producto del gen HD es la proteína citoplasmática huntingtina 348 kDa. La huntingtina tiene una secuencia característica menor de 40 residuos de aminoácidos de glutamina en la forma normal; la huntingtina mutada que causa la enfermedad tiene más de 40 residuos. La expresión continua de moléculas de huntingtina mutantes en células neuronales produce la formación de depósitos de proteína grandes que finalmente dan lugar a muerte celular, especialmente en los lóbulos frontales y los ganglios basales (principalmente en el núcleo caudado). La gravedad de la enfermedad es generalmente proporcional al número de residuos extra.

35 [0004] DM1 es la distrofia muscular más común en adultos y es un trastorno progresivo degenerativo multisistémico heredado de predominantemente el músculo esquelético, corazón y cerebro. DM1 es provocada por expansión de una repetición inestable del trinucleótido (CTG)_n en la región 3' no traducida del gen DMPK (proteína quinasa de distrofia miotónica) en el cromosoma humano 19q (Brook et al, *Cell*, 1992). La distrofia miotónica de tipo 2 (DM2) es provocada por una expansión CCTG en el intrón 1 del gen ZNF9, (Liquori et al, *Science* 2001). En el caso de la distrofia miotónica tipo 1, la exportación citoplásmica nuclear de transcritos DMPK se bloquea por la longitud aumentada de las repeticiones, que forman estructuras secundarias tipo horquilla que se acumulan en focos nucleares. Transcritos DMPK que soportan un largo tracto (CUG)_n pueden formar estructuras tipo horquilla que enlazan proteínas de la familia *muscleblind* y posteriormente se agregan en focos ribonucleares en el núcleo. Estas inclusiones nucleares están pensadas para aislar proteínas *muscleblind*, y potencialmente otros factores, que luego se convierten en limitantes para la célula. En DM2, la acumulación de ARN ZNF9 que lleva las repeticiones expandidas (CCUG)_n forma focos similares.

45 Ya que las proteínas *muscleblind* son factores de empalme, su depleción da lugar a un reordenamiento espectacular en el empalme de otros transcritos. En consecuencia, los transcritos de muchos genes se convierten aberrantemente en empalmados, por ejemplo, por inclusión de exones fetales, o exclusión de exones, dando como resultado proteínas no funcionales y función de célula perjudicada.

50 [0005] Las observaciones y revelaciones nuevas de arriba han conducido a la comprensión de que enfermedades de repetición inestable, como distrofia miotónica tipo 1, la enfermedad de Huntington y otras, pueden ser tratadas eliminando, o completamente o al menos en parte, el transcrito aberrante que causa la enfermedad. Para DM1, el transcrito aberrante que se acumula en el núcleo podría reducirse o quitarse completamente. Reducciones incluso relativamente pequeñas del transcrito aberrante podrían liberar sustancial y posiblemente cantidades suficientes de factores celulares aislados y así ayudar a devolver el procesamiento normal del ARN y el metabolismo celular para DM (Kanadia et al., *PNAS* 2006). En el caso de HD, una reducción en la acumulación de depósitos de proteína de huntingtina en las células de un paciente HD puede mejorar los síntomas de la enfermedad.

55 [0006] Unos pocos intentos se han llevado a cabo para diseñar métodos de tratamiento y medicamentos para repeticiones inestables de la distrofia miotónica tipo 1 usando ácidos nucleicos antisentido, ARN de interferencia o ribozimas.

(i) Langlois et al. (*Molecular Therapy*, Vol. 7 No. 5, 2003) diseñó una ribozima capaz de romper el ARNm DMPK. La ribozima de cabeza de martillo dispone de una extensión ARN complementaria al 3' UTR de DMPK justo antes de la repetición CUG. *In vivo*, la ribozima transcrita de vector fue capaz de romper y disminuir en células modificadas tanto en las repeticiones expandidas CUG con ARNm como en las especies de ARNm normales con un 63 y 50 % respectivamente. Por lo tanto, también el transcrito normal es afectado gravemente por este método y las especies de ARNm afectadas con repeticiones expandidas no son específicamente dirigidas.

(ii) Otro método fue tomado por Langlois et al., (*Journal Biological Chemistry*, vol 280; not.17, 2005) usando ARN de interferencia. Una horquilla corta entregada de lentivirus ARN (ARNhc) fue introducida en mioblastos DM1 y demostraron reducir el ARNm DMPK nuclear mutante retenido. Cuatro moléculas de ARNhc fueron evaluadas, dos fueron complementarias contra las regiones codificadas por DMPK, una contra una única secuencia en el 3' UTR y un control negativo con una secuencia irrelevante. Los primeros dos ARNhc fueron capaces de reducir el transcrito mutante de DMPK con la repetición amplificada a alrededor de 50%, pero incluso más eficaz, la reducción del transcrito citoplasmático de tipo salvaje a alrededor de 30% o menos. El equivalente sintético de ARNsi entregado por lípidos catiónicos fue inefectivo. El ARNhc dirigido a la secuencia 3' UTR probó ser inefectivo para ambos transcritos. Por lo tanto, tampoco este método está dirigido selectivamente a especies de ARNm de repetición expandidas.

(iii) Un tercer método por Furling et al. (*Gene Therapy*, Vol.10, p795-802, 2003) usa un retrovirus recombinante que expresa una larga cadena de 149 pares de bases ARN antisentido para inhibir niveles de ARNm DMPK en mioblastos DM1 humanos. Un retrovirus fue diseñado para proporcionar células DM1 con la larga cadena de 149 pares de bases de ARN antisentido complementario a una cadena de pares de bases de 39 de largo de repetición (CUG)¹³ y una región de 100 pares de bases después de la repetición para aumentar la especificidad. Este método libró una reducción en el transcrito DMPK mutado (repetición expandida) del 80%, en comparación con una reducción de un 50% en el transcrito DMPK de tipo salvaje y la restauración de diferenciación y características funcionales en mioblastos DM1 infectados. Por lo tanto, tampoco este método está dirigido selectivamente a las especies de ARNm de repetición expandidas, depende de un ARN antisentido muy largo y sólo puede usarse en combinación con técnicas de entrega vírica recombinantes.

[0007] Liew et al (*Proceedings of the Japan, Academy series B Tokyo* Vol 798: 293-298, 2003) divulga un ARNsi dirigido contra el gen de la enfermedad de Huntington (HD). Uno de éstos, ARNsi-CAG, incluye un oligonucleótido complementario sólo a una secuencia repetitiva y tiene 21 nucleótidos con 7 repeticiones de CAG (Figura 1). Dicho documento divulga el uso de oligonucleótidos bicatenarios.

[0008] CA-AI-2 526 893 y WO 2004/101787 divulgan un método de inhibición de la expresión de un gen de Huntington usando un ARN bicatenario (ARNds) dirigido a una secuencia de ARNm específica localizada en una región en la proximidad de arriba de la repetición CAG de un gen HD. Un corto (bicatenario ARN (corto ARNsi) de 19-24 pares de bases se usa.

[0009] La patente US 2003/109476 divulga un oligonucleótido para la alteración dirigida de la secuencia genética del gen de la enfermedad de Huntington, comprendiente de un oligonucleótido monocatenario con un dominio de ADN con al menos un desapareamiento con respecto a la secuencia genética del gen HD.

[0010] Yen et al (*Annals of neurology*, Baston 46.(3): 366-373, 1999) divulga enzimas de ADN para la selección de gen HD. Algunos de los oligonucleótidos específicos, repeticiones objetivo CAG, se proporcionan para producir sólo una mínima escisión.

[0011] Caplen et al (*Human molecular genetics* - 11(2): 175-184, 2002) divulga una prueba para ver si el ARNi se puede usar para reducir específicamente un transcrito relacionado con la enfermedad humana usando *Drosophila* y modelos de cultivo de tejidos humanos de la enfermedad genética dominante atrofia muscular espinobulbar (SBMA). ARNds (ARN dúplex) con trectos de repetición CAG sólo indujo la inhibición específica de gen cuando las secuencias flanqueantes fueron incluidas.

[0012] Galderisi et al (*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 221(3): 750-754, 1996) divulga oligonucleótidos antisentido fosforotioatados de 21 nucleótidos que inhiben la expresión de DMPK (a través de RNAsch) en células cultivadas y se proponen como uso potencial para tratar la distrofia miotónica. Dichos ODNs antisentido se dirigen contra la región que circunda el primer ATG de DMPK (página 750-751).

[0013] Los métodos y técnicas anteriormente descritas proporcionan métodos basados en el ácido nucleico que causan descomposición no selectiva del alelo repetido expandido afectado y del alelo no afectado (normal) para enfermedades genéticas que se asocian a la inestabilidad de repetición y/o expansión. Por otra parte, la técnica emplea secuencias específicas para el gen asociado a la enfermedad y no proporciona un método que sea aplicable a más trastornos genéticos asociados a la expansión de repetición. Finalmente, la técnica sólo enseña métodos que implican uso de sistemas de entrega de vectores de ADN recombinante, que necesitan ser adaptados para cada oligonucleótido y célula diana y que todavía necesitan además ser optimizados.

[0014] La presente invención proporciona una solución para estos problemas usando una molécula monocatenaria corta de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia, que sólo es complementaria a la región de repetición expandida, es decir, ésta no depende de la hibridación de secuencias únicas en exones o intrones de la repetición con gen. Además, no es esencial que el ácido nucleico empleado (oligonucleótido) reduzca los transcritos mediados por el mecanismo de descomposición ARN H.

[0015] Sin ánimo de estar atado por la teoría, la presente invención puede causar una reducción en los niveles de transcritos por alteraciones en el tratamiento post-transcripcional y/o empalme prematuro del ARN. Una reducción en los niveles de transcritos por medio de empalme alternativo y/o tratamiento postranscripcional se cree que resulta en transcritos que carecen de repetición instable o muy expandida del (tri)nucleótido, pero que todavía posee actividades funcionales. La reducción de transcritos aberrantes por procesamiento del ARN alterado y/o empalme puede prevenir la acumulación y/o traducción de transcritos aberrantes expandidos de repetición en células.

[0016] Sin ánimo de estar atado por la teoría del método de la presente invención, ésta también está pensada para proporcionar especificidad para el transcrito afectado con la repetición expandida debido a que la cinética para la hibridación de la repetición expandida es más favorable. La probabilidad de que una repetición complementaria de una molécula oligonucleótida de ácido nucleico específico hibride a una extensión complementaria de una molécula de ARN o de ADN aumenta con el tamaño del extensión repetitiva. Moléculas ARN y en particular moléculas ARN comprendientes de secuencias repetitivas son normalmente internamente apareadas, formando una estructura secundaria que comprende bucles abiertos y partes de horquilla cerradas. Sólo las partes abiertas son relativamente accesibles para ácidos nucleicos complementarios. Las extensiones de repetición cortas de un transcrito de tipo salvaje no asociado a enfermedad es frecuentemente sólo de un 5 a sobre 20-40 repeticiones y debido a la estructura secundaria relativamente inaccesible para apareamiento de bases con un ácido nucleico complementario. En cambio, las unidades de repetición de la repetición expandida y el alelo asociado a la enfermedad es normalmente al menos expandido 2 pliegues, pero normalmente incluso más, 3, 5, 10 pliegues, hasta 100 o incluso más de 1000 pliegues de expansión para algunos trastornos de repetición inestables. Esta expansión aumenta la probabilidad de que una parte de la repetición esté, al menos temporalmente, en una estructura de cadena abierta y así más accesible al apareamiento de bases con una molécula de ácido nucleico complementaria, relativo al alelo de tipo salvaje. Así, a pesar del hecho de que el oligonucleótido es complementario a una secuencia de repetición presente en ambos transcritos de tipo salvaje y expandidos de repetición y podrían teóricamente hibridar a ambos transcritos, la presente invención enseña que oligonucleótidos complementarios a los tramos repetitivos preferiblemente hibridan a los transcritos patógenos o asociados a la enfermedad y dejan la función de transcritos normales relativamente inafectada. Este selectividad es provechosa para tratar enfermedades asociadas a inestabilidad de repetición sin tener en cuenta el mecanismo de reducción del transcrito aberrante.

[0017] La invención así divulga reactivos para el uso en un método para el tratamiento de trastornos genéticos asociados a la repetición inestable del elemento cis del ADN, proporcionando moléculas de ácido nucleico que son complementarias a y/o capaces de hibridación de las secuencias repetitivas sólo. Este método así preferentemente se dirige a los transcritos de repetición expandidos y deja a los transcritos del alelo normal de tipo salvaje relativamente inafectados. Esto es ventajoso, ya que el alelo normal puede así proveer la función normal del gen, que es al menos deseable y, dependiendo del gen particular con las repeticiones de ADN inestables, puede en muchos casos ser esencial para tratar a la célula y/o individuo.

[0018] Además, este método no se limita a un trastorno genético asociado a las repeticiones inestables de ADN particular, sino que se puede aplicar a cualquiera de las enfermedades de repeticiones inestables de ADN conocidas, como, pero no limitado a, enfermedades con regiones de codificación repetidas con una repetición de poliglutamina (CAG): Enfermedad de Huntington, síndrome de Haw River, enfermedad de Kennedy/atrofia muscular espinobulbar, ataxia espino-cerebelar. Enfermedades con repeticiones en regiones no codificantes de genes para ser tratadas según la invención comprenden los trastornos de repetición de trinucleótido (principalmente repeticiones CTG y/o CAG): distrofia miotónica de tipo 1, ataxia espino-cerebelar.

Otra ventaja de la presente invención es que los oligonucleótidos específicos para una región de repetición se pueden administrar directamente a las células y esto no depende de sistemas de entrega basados en vector. Las técnicas descritas en la técnica anterior, por ejemplo, aquellas mencionados arriba para el tratamiento de DM1 y la eliminación de transcritos DMPK de células, requieren el uso de sistemas de entrega a base de vector para administrar niveles suficientes de oligonucleótidos a la célula. El uso de plásmido o vectores víricos es aún menos deseable para uso terapéutico debido a reglamentos de seguridad actuales estrictos para vectores terapéuticos de ADN recombinante, la producción de vectores recombinantes suficientes para la amplia aplicación clínica y el control limitado y reversibilidad de una respuesta exagerada (o no-específica) después de la aplicación. Sin embargo, la optimización en el futuro es posible en estas áreas y la entrega vírica de plásmidos podrían producir un efecto de larga duración ventajoso. Los inventores actuales han descubierto sorprendentemente que los oligonucleótidos que comprenden o consisten en una secuencia que es complementaria a secuencias repetitivas de transcritos de repetición expandida, debido a la expansión de su objetivo molecular para hibridación, tienen una afinidad más aumentada y/o avidez para su objetivo en comparación con oligonucleótidos que son específicos para secuencias únicas en un transcrito porque de esta alta afinidad y avidez para el transcrito objetivo expandido de repetición, cantidades inferiores de oligonucleótido suficientes para producir inhibición suficiente y/o reducción del alelo expandido de repetición por degradación RNasa H, ARN de interferencia o actividades de tratamiento alterado postranscripcional (comprendiente pero no limitado a empalme o

salto de exón). Los oligonucleótidos de la presente invención que sólo son complementarios a secuencias repetitivas, se pueden producir sintéticamente y son suficientemente potentes para ser eficaces cuando se entregan directamente a las células usando técnicas aplicadas comúnmente para la entrega directa de oligonucleótidos a células y/o tejidos.

5 Sistemas de entrega de vectores recombinantes pueden, cuando se desea, evitarse usando el método y las moléculas oligonucleótidas de la presente invención.

[0019] En un primer aspecto, la presente invención divulga y enseña el uso de un oligonucleótido que consiste en una secuencia que es complementaria sólo a una secuencia repetitiva en un transcrito de gen humano para la producción de un medicamento para el diagnóstico, tratamiento o prevención de unos trastornos genéticos asociados a la inestabilidad de repetición de elemento cis en seres humanos. La invención, por lo tanto, proporciona reactivos para el uso en un método de tratamiento para trastornos genéticos asociados a la inestabilidad de repetición de elemento cis.

[0020] En un segundo aspecto, la invención también se refiere a un oligonucleótido que se puede usar en el primer aspecto de la invención y/o aplicarse en el método de la invención para prevenir la acumulación y/o traducción de transcritos expandidos de repetición en células.

15 [0021] En una forma de realización más preferida, el oligonucleótido de la invención consiste en una secuencia que es complementaria sólo a una secuencia repetitiva tal y como se define más adelante.

[0022] Una repetición o elemento repetitivo o secuencia repetitiva o extensión repetitiva se define aquí como una repetición de al menos 3, 4, 5, 10, 100, 1000 o más, de una unidad repetitiva o unidad de nucleótido repetitiva o unidad de nucleótido de repetición que comprenden una unidad repetitiva de trinucleótido, o alternativamente un 4, 5 o 6 unidades repetitivas de nucleótido, en una secuencia de genes transcrita en el genoma de un sujeto, incluido un sujeto humano.

[0023] Un oligonucleótido puede ser monocatenario o bicatenario. Bicatenario significa que el oligonucleótido es un heterodímero hecho de dos cadenas complementarias, como en un ARNsi. En una forma de realización preferida, un oligonucleótido es monocatenario. Un oligonucleótido monocatenario tiene diferentes ventajas en comparación con un oligonucleótido ARNsi bicatenario: (i) su síntesis está prevista para ser más fácil que dos cadenas complementarios de ARNsi; (ii) hay una gama más amplia de modificaciones químicas posibles para optimizar una absorción más eficaz en células, una estabilidad (fisiológica) mejor y para reducir los efectos potenciales genéricos adversos; y (iii) ARNsi tiene un potencial más alto para efectos no-específicos y farmacología exagerada (p. ej., menos control posible de eficacia y selectividad por horario de tratamiento o dosis) y los ARNsi (iv) tienen menos posibilidades de actuar en el núcleo y no se pueden dirigir contra los intrones. Por lo tanto, en una forma de realización preferida del primer aspecto, la invención se refiere al uso de un oligonucleótido monocatenario que consiste en una secuencia que es complementaria sólo a una secuencia repetitiva en un transcrito de gen humano para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de unos trastornos genéticos asociados a la inestabilidad de repetición de elemento cis en seres humanos.

[0024] El oligonucleótido(s) preferiblemente comprende al menos de 10 a alrededor de 50 nucleótidos consecutivos complementarios a un elemento repetitivo, más preferiblemente de 12 a 45 nucleótidos, incluso más preferiblemente de 12 a 30, y de forma más preferible de 12 a 25 nucleótidos complementarios a una extensión repetitiva, preferiblemente con una unidad de repetición de trinucleótido. El oligonucleótido puede ser complementario a y/o capaz de hibridación a una extensión repetitiva en una región de codificación de un transcrito, preferiblemente un tracto de codificación de poliglutamina (CAG). El oligonucleótido puede también ser complementario a y/o capaz de hibridación a una región no codificante, por ejemplo, regiones 5' o 3' no codificantes, o secuencias intrónicas presentes en moléculas ARN precursor. En una forma de realización preferida, el oligonucleótido para ser usado en el método de la invención consiste en una secuencia que es complementaria a un elemento repetitivo que tiene como unidad de nucleótido repetitiva una unidad de nucleótido repetitiva seleccionada del grupo que consiste en (CAG)_n y, (CUG)_n, y dicho oligonucleótido es un oligonucleótido monocatenario.

45 Un oligonucleótido que consiste en una secuencia que es complementaria a un tracto de poliglutamina (CAG)_n en un transcrito es particularmente útil para el tratamiento y/o prevención del trastorno humano de la enfermedad de Huntington, diferentes formas de espino- ataxia cerebelar o síndrome de Haw River, atrofia muscular espinobulbar ligada al cromosoma X y/o atrofia dentatorubro-palidoluisiana provocada por expansiones de repetición en los genes HD, HDL2/JPH3, SBMA/AR, SCA1/ATX1, SCA2/ATX2, SCA3/ATX3, SCA6/CACNA1A, SCA7; SCA17, Ar o gen humano DRPLA.

50 [0025] Un oligonucleótido que consiste en una secuencia que es complementaria a una repetición (CUG)_n en un transcrito es particularmente útil para el tratamiento y/o prevención del trastorno humano genético distrofia miotónica tipo 1, espino- ataxia cerebelar 8 y/o enfermedad de Huntington tipo 2 provocada por expansiones de repetición en los genes DM1/DMPK, SCA8 o Jf3 respectivamente. Preferiblemente, estos genes son de origen humano.

[0026] Oligonucleótidos con nucleótidos de ADN al menos en parte de origen natural son útiles para inducir degradación de moléculas híbridas ADN-ARN en la célula por actividad RNasa H (EC.3.1.26.4).

55 [0027] Ribonucleótidos ARN de origen natural o ribonucleótidos sintéticos tipo ARN que comprenden oligonucleótidos se pueden aplicar en el método de la invención para formar ARN-ARN híbridos bicatenarios que hacen de antisentido

dependiente de enzima a través del ARN de interferencia o silenciando vías (RNAi/ARNsi), implicando el reconocimiento de ARN objetivo a través de la unión de la cadena sentido-antisentido seguido de la degradación del ARN objetivo por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

5 [0028] Alternativamente o como complemento, oligonucleótidos antisentido de bloqueo estéricos (antisentido independiente RNasa-H) interfieren con la expresión genética u otro precursor ARN o procesos celulares dependientes de ARN mensajero, en particular, pero no limitado a, empalme de ARN y salto de exón, por unión a una secuencia objetivo de transcrito de ARN y poniéndose en el camino de procesos, como traducción o bloqueo de donante de empalme o sitios aceptores de empalme. Alteración del empalme y técnicas de salto de exón usando oligonucleótidos antisentido modificados están bien documentados, son conocidos por el experto en la materia y pueden, por ejemplo, encontrarse en US6,210,892, WO9426887, WO04/083446 y WO02/24906. Por otra parte, impedimento estérico puede inhibir la unión de proteínas, factores nucleares y otros y así contribuir a la reducción en la acumulación nuclear o focos ribonucleares en la enfermedades como DM1.

15 [0029] Los oligonucleótidos de la invención, que pueden comprender nucleótidos sintéticos o modificados, complementarios a secuencias repetitivas (expandidas) son útiles para el método de la invención para reducir o inactivar la repetición con transcritos por medio de ARNsi / ARN de interferencia o ruta silenciada.

20 [0030] Los oligonucleótidos que se usan en el método de esta invención consisten en 2'-O-metil fosforotioato nucleótidos de ARN. Oligonucleótidos que consisten en una secuencia que es complementaria a una secuencia repetitiva seleccionada del grupo que consiste en (CAG)_n y (CUG)_n, con una longitud de 10 a 50, más preferiblemente de 12 a 35, de forma más preferible de 12 a 25 nucleótidos, y que consisten en, 2'-O-metil fosforotioato nucleótidos de ARN, los nucleótidos son además preferidos para el uso en la invención para el tratamiento de prevención de trastornos genéticos de inestabilidad de repetición de elemento cis.

Por consiguiente, en una forma de realización preferida, un oligonucleótido de la invención y usado en la invención consiste en una secuencia que es complementaria a una secuencia repetitiva seleccionada del grupo que consiste en (CAG)_n y (CUG)_n, tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos y está caracterizado además por el hecho de que:

- 25 a) que consiste en 2'-O-sustituido fosforotioato nucleótidos de ARN, como 2'-O-metil fosforotioato nucleótidos de ARN. Los nucleótidos podrían ser usados en cualquier combinación y/o con fosforotioato de nucleótido de ADN o ARN; y/o
- b) es un oligonucleótido monocatenario.

30 [0031] Aunque el uso de un único oligonucleótido puede ser suficiente para la reducción de la cantidad de transcritos expandidos de repetición, como acumulado nuclear DMPK o transcritos ZNF9 o segmentos de éstos o una reducción suficiente de acumulación de repetición expandida de proteína HD, está también dentro del campo de la invención para combinar 2, 3, 4, 5 o más oligonucleótidos. El oligonucleótido que consiste en una secuencia que es complementaria a una parte repetitiva de un transcrito puede ser ventajosamente combinado con oligonucleótidos que consisten en secuencias que son complementarias a y/o capaces de hibridación con secuencias únicas en una repetición con transcrito. Los medicamentos de la invención que contienen oligonucleótidos específicos de repetición pueden también combinarse con cualquier otro tratamiento o medicamento de trastorno genético de inestabilidad de repetición de elemento cis.

40 [0032] Los oligonucleótidos para uso según la invención se adecuan para la administración directa a células, tejidos y/o *in vivo* de órganos de individuos afectados por o a riesgo de desarrollar un trastorno de inestabilidad de repetición de elemento cis y se pueden administrar directamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

45 [0033] En una forma de realización preferida, una concentración de oligonucleótido, que está dispuesta entre sobre 0,1 nM y 1 µM se usa. Más preferiblemente, la concentración usada se sitúa en el intervalo entre alrededor de 0,3 a 400 nM, incluso más preferiblemente, entre sobre 1 a 200 nM. Si diferentes oligonucleótidos se usan, esta concentración puede referirse a la concentración total de oligonucleótidos o la concentración de cada oligonucleótido añadido. Los intervalos de concentración de oligonucleótido(s) tal como se proporcionan arriba son concentraciones preferidas para uso *in vitro* o *ex vivo*. El experto en la materia entenderá que dependiendo del oligonucleótido(s) usado, la célula diana tratada, el gen objetivo y sus niveles de expresión, el medio usado y la transfección y condiciones de incubación, la concentración de oligonucleótido(s) usada puede además variar y puede precisar para ser optimizada cualquier otro.

50 [0034] Más preferiblemente, los oligonucleótidos que se usan en la invención para prevenir o tratar trastornos de inestabilidad de repetición de elemento cis se producen sintéticamente y se administran directamente a células, tejidos, órganos y/o pacientes en la forma formulada en composiciones farmacéuticamente aceptables. La entrega de las composiciones farmacéuticas al sujeto se realiza preferiblemente por una o más inyecciones parenterales, por ejemplo, administraciones intravenosas y/o subcutáneas y/o intramusculares y/o intratecales y/o intraventriculares, preferiblemente inyecciones, a uno o a múltiples sitios del cuerpo humano. Una administración intraventricular o intratecal (en el líquido cefalorraquídeo) se realiza preferiblemente introduciendo una bomba de difusión en el cuerpo de un sujeto. Diferentes bombas de difusión se conocen por el experto en la materia.

[0035] Composiciones farmacéuticas que se deben usar para dirigir las moléculas oligonucleótidas que comprenden o que consisten en una secuencia que es complementaria a secuencias repetitivas pueden comprender varios excipientes, tales como diluyentes, productos de relleno, conservantes, solubilizantes y similares, que pueden, por ejemplo, encontrarse en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

[0036] Particularmente preferido para el método de la invención es el uso de excipientes que ayudan en la entrega de los oligonucleótidos a las células y en las células, en particular excipientes capaces de formar complejos, vesículas y/o liposomas que entregan sustancias y/o oligonucleótido(s) complejos o atrapados en las vesículas o liposomas a través de una membrana celular. Muchas de estas sustancias se conocen en la técnica. Sustancias adecuadas comprenden polietilenimina (PEI), ExGen 500, anfifilos sintéticos (SAINT-18), Lipofectin™, DOTAP y/o proteínas cápsidas víricas que son capaces de auto ensamblarse en partículas que pueden entregar oligonucleótidos a células. Lipofectin representa un ejemplo de agentes liposómicos de transfección. Consiste en dos componentes lípidos, un lípido catiónico N-[1-(2,3 dioleoiloxi)propil]-N,N,N- trimetilamonio cloruro (DOTMA) (cp. DOTAP que es la sal de metilsulfato) y una dioleoilfosfatidiletanolamina de lípido neutra (DOPE). El componente neutro media la liberación intracelular. Otro grupo de sistemas de entrega son nanopartículas poliméricas. Policationes, como dietilaminoetilaminoetil (DEAE)-dextrano, que son bien conocidos como reactivos de transfección de ADN se pueden combinar con butilcianoacrilato (PBCA) y hexilcianoacrilato (PHCA) para formular nanopartículas catiónicas que pueden entregar oligonucleótidos a través de membranas celulares en células. Además de estos materiales de nanopartícula comunes, la protamina peptídica catiónica ofrece un método alternativo para formular oligonucleótidos como coloides. Este sistema de nanopartícula coloidal puede formar los así llamados proticles, que se pueden preparar por un simple proceso de autoensamblaje para agrupar y mediar la liberación intracelular de los oligonucleótidos. El experto en la materia puede seleccionar y adaptar cualquiera de los anteriores u otros excipientes alternativos disponibles comercialmente y sistemas de entrega para empaquetar y entregar oligonucleótidos para su uso en la presente invención, para entregar oligonucleótidos para el tratamiento de los trastornos de inestabilidad de repetición de elemento cis en seres humanos.

[0037] La invención también se refiere a un método *in vitro* para la reducción de la repetición con transcritos de gen en una célula comprendiendo la administración de una molécula oligonucleótida monocatenaria, que consiste en 2'-O-sustituido fosforotioato nucleótidos de ARN, como 2'-O-metil fosforotioato nucleótidos de ARN y con una longitud de 10 a 50 nucleótidos que sólo son complementarias a la secuencia repetitiva. Los nucleótidos podrían usarse en combinación y/o con nucleótidos de fosforotioato de ADN.

[0038] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que las unidades después de la palabra se incluyen, pero combinaciones y/o unidades que no se mencionan específicamente no se excluyen. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que ahí hay uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", por lo tanto, normalmente significa "al menos uno".

Leyendas de las figuras

[0039]

Figura 1: Transferencia Northern de ARN aislado de miotubos modificados con diferentes oligonucleótidos o control simulado. Los miotubos fueron derivados de líneas celulares de mioblasto de ratón inmortal con unos genes transgénicos humanos DMPK con longitud de expansión de repetición (CTG)_n de aproximadamente 500 junto a su gen DMPK de ratón normal sin repetición (CTG). La transferencia muestra ARNm DMPK humano (superior), ARNm DMPK (mDMPK) de ratón (medio) y ARNm GAPDH de ratón (inferior).

Figura 2: Las señales de DMPK de humano y de ratón de la figura 1 se cuantificaron por análisis fosforimager y se normalizaron a la señal GAPDH. Los resultados se expresan relativos al tratamiento simulado (establecidos a 100).

Figura 3: Transferencia Northern del total de ARN aislado de miotubos de murina con un gen quimérico ratón-humano DMPK en el que la parte 3' del gen mDMPK fue sustituido por el segmento de cognado del gen humano DMPK que incluye una repetición (CTG)₁₁₀. La transferencia fue evaluada para ARNm DMPK (panel superior) y ARNm GAPDH de ratón (inferior). La células se modificaron con oligonucleótido antisentido PS58 o control.

La figura 4 muestra la respuesta de miotubos DM500 tratados con varias concentraciones de oligonucleótido PS58.

La expresión de hDMPK fue cuantificada por medio de análisis de transferencia de Northern seguido de análisis fosforimager. La señal fue normalizada a la señal GAPDH y expresada relativa a la respuesta después del tratamiento simulado.

La figura 5 muestra la transferencia Northern del total de ARN de miotubos DM500 modificados con 200nM PS58 a puntos de tiempo distintos: 2h, 4h, 8h y 48h antes de la recolección. El tratamiento simulado se realizó 48h antes de la recolección. La transferencia Northern muestra DMPK de humano y de ratón y GAPDH ARNm de ratón. Estos fueron cuantificados por fosforimager y la señal normalizada DMPK fue expresada en relación al tratamiento simulado.

La [figura 6](#) muestra la transferencia Northern del total de ARN de miotubos DM500 recolectados 2d, 4d, 6d y 8d después de transfección con 200 nM PS58 o control simulado. El análisis de transferencia de Northern y la cuantificación se realizaron como antes.

5 La [figura 7](#) muestra una transferencia Northern del total de ARN de mioblastos myoD-transformado tratados con oligonucleótido PS58 (20 y 200 nM) o control simulado. Los mioblastos fueron derivados de fibroblastos obtenidos de un paciente con una distrofia miotónica congénita tipo 1 que soporta un alelo hDMPK con una longitud de expansión de repetición de triplete de aproximadamente 1500 y un alelo hDMPK con longitud normal de 11 repeticiones. La transferencia Northern fue hibridizada con una sonda de DMPK (hDMPK) de humano y una sonda de ARNm GAPDH. Las señales DMPK de humano fueron normalizadas a la señal GAPDH y expresadas en relación al control simulado.

10 La [figura 8](#) muestra el análisis RT-PCR de miotubos DM500 modificados con 200 nM de oligonucleótido PS58, específico sólo a la secuencia de repetición (CUG), oligonucleótido PS113, específico a una secuencia en el exón 1, o control simulado. El análisis RT-PCR fue realizado con cebadores específicos para ARNm hDMPK y tres de otros transcritos de gen con una repetición (CUG) de origen natural en ratones: Ptbp1 ARNm con un (CUG)6, Sindecin-3 ARNm con un (CUG)6 y Taxilinbeta ARNm con un (CUG)9. La intensidad de las señales fueron normalizadas a la señal de actina y expresadas en relación al control simulado.

15 La [figura 9](#) muestra el análisis FISH de mioblastos DM500 modificados con 200nM PS58 (B) o control simulado (A). Cuarenta y ocho horas después del inicio del tratamiento, las células fueron lavadas y fijadas y posteriormente hibridizadas con oligonucleótido Cy3-(CAG)10-Cy3 marcado fluorescentemente. Los focos ribonucleares indicativos de agregación ARNm hDMPK (CUG)500 en el núcleo fueron visualizados usando un microscopio de escaneo de láser confocal Bio-Rad MRC1024 y software de adquisición LaserSharp2000.

20 La [figura 10](#) muestra el número relativo de células para la presencia de focos ribonucleares en el núcleo de mioblastos DM500 modificados con PS58 o control simulado del experimento representado en la figura 9.

25 La [figura 11](#) muestra el análisis RT-PCR de ARNm hDMPK en el músculo de ratones DM500 tratados con PS58 o control simulado. Brevemente, PS58 (2nmol) fue inyectado en el complejo GPS de ratones DM500 con un año de edad y este procedimiento se repitió 24h después. Después de 15 días, *M. plantaris* y *M. gastrocnemius* fueron aislados y se realizó RT-PCR en el total de ARN para hDMPK y actina de ratón. La intensidad de la señal hDMPK fue normalizada a la señal de actina y los valores se expresaron en relación al control simulado.

30 La [figura 12](#) muestra un análisis de transferencia Northern de miotubos DM500 tratados con oligonucleótidos diferentes (200nM) o control simulado. PS58, PS146 y PS147 llevaron un esqueleto 2'O-metil de fosforotioato completo, pero difirieron en la longitud, (CAG)7; (CUG)10 y (CUG)5, respectivamente. PS142 tiene un esqueleto ADN de fosforotioato completo con una secuencia (CAG) 7. La señales hDMPK y mDMPK fueron normalizadas a GAPDH de ratón y expresadas como porcentaje de control simulado. La cuantificación se muestra en el panel inferior.

Ejemplos

Ejemplo 1

35 [0040] Líneas celulares de inmortalomioblastos se derivaron de DM500 o CTG110 de ratones usando técnicas estándar conocidas por el experto en la materia. Ratones DM500 fueron derivados de ratones obtenidos del grupo de Gourdon en París. Ratones CTG110 se describen abajo y están presentes en el grupo de Wieringa y Wansink en Nijmegen. Líneas celulares de inmortalomioblasto DM500 o CTG110 con longitud de repeticiones (CTG)n variable en el gen DMPK fueron cultivadas subconfluentes y mantenidas en una atmósfera de CO₂ 5% a 33°C en platos revestidos con gelatina 0,1%. Células de mioblasto fueron cultivadas subconfluentes en DMEM complementado con FCS 20%, 50 µg/ml de gentamicina y 20 unidades de γ-interferón-ml. La formación del miotubo fue inducida cultivando células de mioblasto en platos revestidos Matrigel (BD Biosciences) y colocando un cultivo de mioblasto confluyente a 37 °C y en DMEM complementado con suero de caballo 5% y 50 µg/ml de gentamicina. Después de cinco días en este medio de suero bajo, miotubos contraídos crecieron en el cultivo y fueron modificados con los oligonucleótidos deseados. Para transfección NaCl (500 mM, filtro estéril), oligonucleótido y reactivos de transfección PEI (ExGen 500, Fermentas) fueron añadidos en este orden específico y se mezclaron directamente. La solución de transfección oligonucleótida contenía una proporción de 5 µl de ExGen500 por µg de oligonucleótido de acuerdo con las instrucciones (ExGen 500, Fermentas). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente la solución de transfección oligonucleótida se añadió al medio de suero bajo con los miotubos cultivados y se mezclaron suavemente. La concentración oligonucleótida final fue 200nM. El tratamiento de control simulado se realiza con solución de transfección sin un oligonucleótido. Después de cuatro horas de incubación a 37 °C, medio fresco se añadió al cultivo (dando como resultado una dilución de aproximadamente 2,3x) y la incubación se alargó durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, el medio con el oligonucleótido se retiró y medio fresco de suero bajo se añadió a los miotubos que se mantuvieron en el cultivo a 37 °C durante otro día. Cuarenta y ocho horas después de la adición de oligonucleótido al cultivo de miotubo (que es siete días después de la conmutación a condiciones bajas de suero para formación de miotubo inducida), se aisló el ARN con el "Total RNA mini kit" (Bio-Rad) y se preparó para transferencia de Northern y análisis RT-PCR. La transferencia Northern se hibridizó con una sonda de DMPK (hDMPK) radiactiva humana y una

sonda GAPDH de ratón. La sonda usada para DMPK es ADNc DMPK humano que consiste en el marco abierto de lectura DMPK con 3' UTR completo y 11 CTGs.

5 [0041] La señal DMPK de humano y de ratón se cuantificó por análisis fosforimager y se normalizó a la señal GAPDH. Los cebadores que se usaron para el RT-PCR para ARNm hDMPK se situaron en la parte 3' no traducida con la secuencia 5'-GGGGGATCACAGACCATT-3' y 5'-TCAATGCATCCAAAACGTGGA-3' y para actina de murina los cebadores fueron los siguientes: actina sentido 5'-GCTAYGAGCTGCCTGACGG-3' y actina antisentido 5'-GAGGCCAGGATGGAGCC-3'. Los productos PCR se realizaron en un gel de agarosa y la señal se cuantificó usando Labworks 4.0 (UVP Biolinaging systems, Cambridge, Reino Unido). La intensidad de cada banda fue normalizada a la intensidad de la banda de actina correspondiente y se expresó en relación al control simulado.

10 [0042] Trece oligonucleótidos diferentes fueron evaluados (para resumen ver **tabla 1**) como se ha descrito anteriormente en la línea celular immortomioblasto DM500 con gen transgénico DMPK de humano con longitud de repetición (CTG)_n de aproximadamente 500 y un gen DMPK de ratón normal sin repetición (CTG). La **figura 1** muestra la transferencia Northern del ARN aislado de los miotubos modificados del oligonucleótido visualizados con la sonda hDMPK y una sonda GAPDH para control de carga. Cuantificación del humano DMPK (con CTG repetición) y señal de murina DMPK (sin CTG repetición) en la Northern, la transferencia se muestra en la **figura 2**. La señal se normalizó a murina GAPDH y se expresó en relación al control simulado.

[0043] La **tabla 2** indica el nivel de reducción de ARNm hDMPK que es provocado por un oligonucleótido específico.

20 El signo menos (-) se utiliza para no reducción y el número de signos positivos (+) se utiliza para el nivel relativo de ARNm hDMPK desglosado. Claramente, oligonucleótido PS58, específicamente dirigido a la secuencia de repetición, es mucho más potente en la reducción o en la alteración de transcritos hDMPK que los otros oligonucleótidos complementarios a secuencias únicas en los transcritos hDMPK.

25 [0044] La **figura 3** muestra el efecto de PS58 en los immortomioblastos de murina derivados de ratones CTG 110, un ratón *knockin* con un gen DMPK con la parte 3' del gen humano DMPK que incluye una repetición (CTG) de aproximadamente 110. El análisis de transferencia de Northern muestra que el transcrito DMPK con la repetición (CTG)₁₁₀ fue reducido por el tratamiento con oligonucleótido PS58, pero no después de tratamiento simulado.

Ejemplo 2 (Figura 4)

30 [0045] La línea celular de immortomioblasto DM500 que lleva un gen humano DMPK con una expansión de repetición (CTG)₅₀₀ aproximada fue cultivada, preparada y modificada como se ha descrito anteriormente (véase ejemplo 1). En este ejemplo, la transfección se efectuó con PS58 a concentraciones diferentes. Ochenta y cuatro horas después del inicio del tratamiento, los miotubos se recolectaron y se realizó un análisis de transferencia de Northern en ARN aislado como se ha descrito anteriormente (véase ejemplo 1).

[0046] La **figura 4** muestra la cuantificación de la señal de ARNm hDMPK realizada por análisis fosforimager y normalizada a la señal GAPDH a concentraciones diferentes. Bajo estas condiciones, el efecto máximo de medio fue observado a alrededor de 1 nM.

35 Ejemplo 3 (Figuras 5 y 6)

40 [0047] La línea celular de immortomioblasto DM500 que lleva un gen humano DMPK con una expansión de repetición (CTG)₅₀₀ aproximada fue cultivada, preparada y modificada como se ha descrito anteriormente (véase ejemplo 1). No obstante, en este ejemplo la transfección con 200nM de PS58 se efectuó en puntos de tiempo diferentes. Normalmente, los miotubos DM500 se recolectaron siete días después de la conmutación a bajas condiciones de suero para inducir la formación de miotubos. El procedimiento estándar (como en el ejemplo 1 y 2) fue para iniciar el tratamiento (transfección) 48h (dos días) antes de la recolección. Ahora, el tratamiento con PS58 comenzó 2h - 48h (Figura 5) o 2d-8d (Figura 6) antes de la recolección. El análisis de transferencia de Northern y la cuantificación se realizaron como antes.

45 [0048] La figura 5 muestra que el ARNm hDMPK expandido en miotubos DM500 fue disminuido rápidamente en 2 h de tratamiento con oligonucleótido PS58 en comparación con tratamiento de control simulado.

50 [0049] La figura 6 muestra una reducción persistente en el ARNm hDMPK expandido en miotubos DM500 durante al menos 8 días. Hay que tener en cuenta que en el caso del experimento de 8d, las células fueron modificadas en la fase de mioblasto (aproximadamente confluyentes 60%, 33°C, suero alto) y que recibieron medio fresco en varias ocasiones hasta la recolección (incluyendo un cambio a suero bajo a 37 °C, dos días después de la transfección). Los ejemplos 2 y 3 son indicativos de una intervención inhibitoria altamente eficaz por un oligonucleótido dirigido únicamente a la expansión de repetición. La magnitud de este efecto puede estar influenciada por los niveles bajos relativos de expresión hDMPK en estos sistemas de modelo celular, que normalmente también se ha visto en seres humanos.

Ejemplo 4 (Figura 7)

[0050] En este ejemplo, los fibroblastos obtenidos de un paciente humano con distrofia miotónica congénita (cDM1) fueron usados. Estas células del paciente llevan un alelo DMPK causante de una enfermedad con una longitud de expansión de repetición de triplete de 1500 y un alelo normal DMPK con una longitud de repetición de 11. El tamaño del

5

[0051] Los fibroblastos fueron cultivados subconfluentes y mantenidos en una atmósfera CO₂ 5% a 37°C en platos revestidos con gelatina 0,1%. Los fibroblastos fueron cultivados subconfluentes en DMEM complementado con FCS 10% y 50 µg/ml de gentamicina. La formación de miotubo se indujo cultivando células de fibroblastos en platos revestidos Matrigel (BD Biosciences) e infectando las células para confluencia 75% con adenovirus myoD-expresión, (ad5Fib50MyoD Crucell, Leiden) (MOI=100) en DMEM complementado con HS 2% y 50 µg/ml de gentamicina durante 2 horas. Después del periodo de incubación el adenovirus MyoD se retiró y DMEM complementado con FCS 10% y 50 µg/ml de gentamicina se añadió. Las células se mantuvieron en este medio en una atmósfera CO₂ 5% a 37°C hasta confluencia 100%. A estas células de punto se las colocó en DMEM complementado con FCS 2% y 50 µg/ml de gentamicina. Después de cinco días en este medio de suero bajo, las células fueron modificadas con PS58 después del procedimiento según las instrucciones (ExGen 500, Fermentas) y como se ha descrito anteriormente. La concentración oligonucleótida final fue 200 nM y 20 nM. Cuarenta y ocho horas después del inicio del tratamiento (que es siete días después de la conmutación a condiciones de suero bajo), el ARN fue aislado con el "Total RNA mini kit" (Bio-Rad) y preparado para transferencia de Northern. La transferencia de Northern fue hibridada con un DMPK humano radiactivo (hDMPK) y sonda de ARNm GAPDH de ratón. Las señales DMPK humanas se cuantificaron por análisis fosforimager y se normalizaron a la señal GAPDH y se expresaron en relación al control simulado.

10

15

20

[0052] La figura 7 muestra el análisis de transferencia de Northern de los mioblastos myoD-transformado tratados con oligonucleótido PS58 (20 y 200 nM). Los resultados demuestran una inhibición completa eficaz del patógeno hDMPK (CUG) 1500 transcrito de ARN, mientras el normal más pequeño hDMPK (CUG)11 transcrito de ARN sólo es afectado moderadamente a las dos concentraciones. Así, oligonucleótidos dirigidos a la región de repetición con exposición de selectividad hacia el tamaño de repetición más grande (o expansión del causante de la enfermedad).

25

Ejemplo 5 (Figura 8)

[0053] En este ejemplo, la línea celular de inmortalmioblasto DM500 que lleva un gen humano DMPK con una expansión de repetición (CTG)500 aproximada fue cultivada, modificada y analizada como se describe antes en el ejemplo 1. Los miotubos DM500 fueron tratados 48h antes de la recolección con 200 nM de oligonucleótido PS58, específico sólo a la secuencia de repetición (CUG), oligonucleótido PS113, específico a una secuencia en el exón 1, o control simulado. El análisis RT-PCR se realizó en el ARNm hDMPK expresado en esta línea celular de murina (para cebadores véase ejemplo 1) y en otros tres transcritos de gen con una repetición en ratones (CUG) de origen natural, Ptbp1 con un (CUG)6, Sindecin-3 con un (CUG)6 y Taxilinbeta con un (CUG)9.

30

[0054] Los cebadores de la PCR usados fueron para Ptbp1: 5'-TCTGTCCCTAATGTCCATGG-3' y 5'-GCCATCTGCACAAGTGCGT-3'; para Sindecin-3: 5'-GCTGTTGCTGCCACCGCT-3' y 5'-GGCGCCTCGGGAGTGCTA-3'; y para Taxilinbeta: 5'-CTCAGCCCTGCTGCCTGT-3' y 5'-CAGACCCATACGTGCTTATG-3'. Los productos PCR se usaron en un gel de agarosa y las señales se cuantificaron usando el programa de Labworks 4.0 (UVP Bioluminescence Systems, Cambridge, Reino Unido). La intensidad de cada señal fue normalizada a la señal de actina correspondiente y expresada en relación al control simulado.

35

40

[0055] La figura 8 muestra los resultados RT-PCR con una inhibición máxima de expresión de ARNm hDMPK por PS58.

Los otros transcritos de gen que llevan una pequeña repetición (CUG) de origen natural no eran o sólo eran afectados de manera marginal por el oligonucleótido PS58, específico a la repetición (CUG), en comparación con oligonucleótido PS113, que no tiene secuencia complementaria a estos transcritos de gen.

[0056] Este ejemplo confirma la selectividad de un oligonucleótido, dirigido solamente a la región de repetición, hacia el tamaño de repetición largo (o expansión causante de enfermedad) en comparación con tamaños de repetición más cortos de origen natural.

45

Ejemplo 6 (Figuras 9 y 10)

[0057] En este ejemplo, la línea límite del inmortalmioblasto DM500 que lleva un gen humano DMPK con una expansión de repetición (CTG)500 aproximada fue cultivada y modificada con PS58 (200 nM). Aquí, análisis FISH se efectuó en las células. Cuarenta y ocho horas después del inicio del tratamiento, las células fueron fijadas con formaldehído 4%, 5mM de MgCl₂ y PBS 1x durante 30 minutos. La hibridación con oligonucleótido fluorescentemente marcado Cy3-(CAG)10-Cy3 se realizó durante toda la noche a 37°C en una cámara húmeda. Después de la hibridación, el material fue lavado y montado en el Mowiol y se le permitió secar durante toda la noche. Inclusiones nucleares (focos ribonucleares) fueron visualizados usando un microscopio de escaneo de láser confocal Bio-Rad MRC1024 y software de adquisición LaserSharp2000. En total 50 células fueron contadas y marcadas para la presencia de inclusiones en los núcleos de estas células.

50

55

[0058] La literatura indica que ARNm DMPK con una repetición expandida (CUG) se acumula y se agrega en el núcleo para formar focos ribonucleares con proteínas reguladoras nucleares y factores de transcripción. Por lo tanto, el procesamiento de gen nuclear normal y la función celular resultan perjudicados.

5 [0059] La figura 9 muestra una célula tratada simuladamente con inclusiones ribonucleares en el núcleo, aunque no están ya presentes en el núcleo celular después del tratamiento con PS58. La figura 10 muestra que el porcentaje de núcleos con focos ribonucleares vistos bajo condiciones de control en miotubos DM500 disminuye fuertemente por el tratamiento con PS58. Este resultado demuestra que la inhibición de la expresión de ARNm hDMPK también inhibe las inclusiones ricas de la repetición de triplete rotado de enfermedad (CUG).

Ejemplo 7 (Figura 11)

10 [0060] Aquí, el efecto de PS58 fue evaluado *in vivo* en ratones DM500 con hDMPK con una (CTG)_n de aproximadamente 500 tripletes. Los ratones DM500 fueron derivados por expansión somática del ratón DM300 (p. ej. ver Gomes-Pereira M et al (2007) *PLoS Genet.* 2007 3(4): e52). Una expansión de repetición de triplete (CTG) de aproximadamente 500 se confirmó por transferencia de Southern y análisis PCR.

15 [0061] En resumen, PS58 fue mezclado con agente de transfección ExGen 500 (Fermentas) según las instrucciones que acompañan para uso *in vivo*. PS58 (2 nmol, en la solución de transfección con ExGen 500) se inyectó (40 µl) en el complejo GPS de ratones DM500 de un año de edad y este procedimiento se repitió después de 24h. Como control, ratones DM500 fueron tratados de forma similar con la solución de transfección sin PS58. Después de 15 días, los ratones fueron sacrificados, los músculos fueron aislados y el total de ARN fue aislado de los tejidos (usando Trizol, Invitrogen). El análisis RT-PCR se realizó para detectar ARNm hDMPK en el músculo de manera similar a como se ha descrito anteriormente. La intensidad de cada banda fue realizada usando el programa de Labworks 4.0 (UVP
20 Bioluminescence systems, Cambridge, Reino Unido) y normalizado a la intensidad de la banda de actina correspondiente.

La ubicación del cebador se indica en la figura.

25 [0062] La figura 11 muestra que el tratamiento *in vivo* de ratones DM500 con PS58 redujo fuertemente la presencia de ARNm hDMPK con una expansión de repetición (CUG)_n en comparación con el tratamiento simulado en el *M. plantaris* y *M. Gastrocnemius*.

Ejemplo 8 (Figura 12)

30 [0063] En este ejemplo, oligonucleótidos diferentes (en longitud y química de esqueleto), pero todos con una secuencia dirigida solamente a la expansión de repetición (CTG)_n, se compararon. Miotubos DM500 fueron cultivados, modificados y analizados como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Las transferencias de Northern se cuantificaron por análisis fosforimager y señales DMPK se normalizaron a GAPDH.

[0064] Aquí, los miotubos DM500 fueron tratados con los siguientes oligonucleótidos (200nM), todos con un esqueleto de fosforotioato completo (ver tabla 3).

35 [0065] La figura 12 muestra que el tratamiento de los miotubos DM500 produce una reducción completa de (CUG)_n expandido ARNm hDMPK para todos oligonucleótidos evaluados. En las presentes condiciones, el efecto máximo obtenible es independiente de la longitud oligonucleotídica, la modificación del esqueleto o el mecanismo potencial de inhibición por los oligonucleótidos monocatenarios empleados.

Ejemplo 9

40 [0066] Fibroblastos (GM 00305) de un paciente masculino con la enfermedad de Huntington se obtuvieron del Coriell Cell Repository (Camden, Nueva Jersey, EEUU) y se cultivaron según las instrucciones que acompañan y las técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica. Pacientes con Huntington llevan un alelo saludable y otro patógeno del gen de Huntington dando como resultado la expresión de ambos ARNm con un número normal y un número expandido de repeticiones (CAG), respectivamente.

45 [0067] Los fibroblastos fueron modificados con un 21-mer 2'O-metil fosforotioato oligonucleotídico de ARN antisentido PS57 con una secuencia (CUG)₇ complementaria a la repetición de triplete (CAG) en el ARNm de Huntington. La transfección ocurrió a 100 o 200 nM en presencia de PEI como indica el fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se recolectaron y el total del ARN se aisló y analizó por RT-PCR. El transcrito de Huntington se determinó usando cebadores en el exón *downstream* 64 (5' CTTC TAGAA CCGGG TCAGT GAAAG 3' y 5' TAGCA CTCCA ACCCG CAGAT un 3'). Este método detecta ambos tipos de ARNm de Huntington, el transcrito mutante y el normal con la expansión adicional (CAG). ARNm GAPDH (gen *housekeeping*) fue también determinado. Las señales fueron cuantificadas y la cantidad total de ARNm de Huntington fue normalizada a la cantidad de GAPDH ARNm en la
50 misma muestra. Los resultados se expresan en relación a un control tratado (sin oligonucleotídico) muestra de fibroblastos (que fue a 100%).

[0068] En las muestras de fibroblastos modificadas con o bien 100, o 200 nM de PS57, niveles significativamente inferiores de niveles totales de ARNm de Huntington se observaron de aproximadamente 53% y 66% en comparación con los niveles en células de control tratadas, respectivamente.

5 [0069] Así, PS57, un oligonucleótido dirigido sólo a la repetición (CAG), induce una reducción en los niveles de ARNm de Huntington y estos resultados concuerdan con una inhibición selectiva de ARNm de Huntington mutante sobre normal.

Tabla 1: Resumen de oligonucleótidos evaluados

Nombre oligo	Modificación	Secuencia	Posición
PS40	2'OMe ARN fosforotioato/FAM	GAGGGGCGUCCAGGGAUCCG	intrón 14-exón 15
PS41	2'OMe ARN fosforotioato	GCGUCCAGGGAUCCGGACCG	intrón 14-exón 15
PS42	2'OMe ARN fosforotioato	CAGGGAUCCGGACCGGAUAG	intrón 14-exón 15
PS56	ADN	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	repetición en exón 15
PS58	2'OMe ARN fosforotioato/FAM	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	repetición en exón 15
PS59	2'OMe ARN fosforotioato	UGAGUUGGCCGCGUGGGCC	ESE exón 15
PS60	2'OMe ARN fosforotioato	UUCUAGGGUUCAGGGAGCGCGG	ESE exón 15
PS61	2'OMe ARN fosforotioato	ACUGGAGCUGGGCGGAGACCC	ESE exón 15
PS62	2'OMe ARN fosforotioato	CUCCCCGGCCGCUAGGGGGC	ESE exón 15
PS113	ADN fosforotioato	GAGCCGCCTCAGCCGCACCTC	Exón 1
PS114	ADN fosforotioato	GAAGTCGGCCACGTAATTGTC	Exón 1
PS115	ADN fosforotioato	GGAGTCGAAGACAGTTCTAGG	Exón 15
PS116	ADN fosforotioato	GGTACACAGGACTGGAGCTGG	Exón 15

10

Tabla 2. Reducción de hDMPK ARNm después transfección de oligo:

Oligo	Reducción ARNm hDMPK	SEC ID Nos.
PS40	+	1
PS41	-	2
PS42	-	3
PS59	-	4
PS60	-	5
PS61	+/-	6
PS62	-	7
PS58	++++	8
PS56	-	9
PS113	-	10
PS114	-	11
PS115	+/-	12
PS116	+	13

(-) indica no reducción, (+) indica nivel de reducción en ARNm hDMPK

Tabla 3: Oligonucleótidos usados en el ejemplo 9

Nº	Longitud	(CAG)n	Sustitución ribosa	Posible rotura RNAsa H
PS58	21-mer	n=7	2'O-Metil	No
PS146	30-mer	n=10	2'O-Metil	No
PS147	15-mer	n=5	2'O-Metil	No
PS 142	21-mer	n=7	Desoxirribosa (ADN)	Sí

* todos los oligonucleótidos fosforotioato longitud total y substitución

15

Listado de secuencias

5 [0070]
 <110> Prosensa B.V.
 <120> Métodos y medios para el tratamiento de trastornos genéticos asociados a inestabilidad de repetición de ADN

10 <130> P6010168PCT
 <150> EP06118809.0
 <151> 2006-08-11

15 <150> EP06119247.2
 <151> 2006-08-21
 <160> 34

20 <170> Versión de patentIn 3.3
 <210> 1
 <211> 20
 <212> ARN

25 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Oligonucleótido PS40 químicamente sintetizado

30 <400> 1
 gaggggcguc cagggauccg 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ARN

35 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Oligonucleótido PS41 químicamente sintetizado

40 <400> 2
 gcguccaggg auccggaccg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ARN

45 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Oligonucleótido PS42 químicamente sintetizado

50 <400> 3
 cagggauccg gaccggauag 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN

55 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Oligonucleótido PS56 químicamente sintetizado

60 <400> 4
 cagcagcagc agcagcagca g 21

65 <210> 5

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Desconocido

5 <220>
 <223> Oligonucleótido PS57 químicamente sintetizado

<400> 5
 cugcugcugc ugcugcugcu g 21

10 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Desconocido

15 <220>
 <223> Oligonucleótido PS58 químicamente sintetizado

<400> 6
 20 cagcagcagc agcagcagca g 21

<210> 7
 <211> 20
 <212> ARN
 25 <213> Desconocido

<220>
 <223> Oligonucleótido PS59 químicamente sintetizado

30 <400> 7
 ugaguuggcc ggcgugggcc 20

<210> 8
 <211> 22
 35 <212> ARN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Oligonucleótido PS60 químicamente sintetizado

40 <400> 8
 uucuagguu cagggagcgc gg 22

<210> 9
 45 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Desconocido

<220>
 50 <223> Oligonucleótido PS61 químicamente sintetizado

<400> 9
 acuggagcug ggcggagacc c 21

<210> 10
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Desconocido

60 <220>
 <223> Oligonucleótido PS62 químicamente sintetizado

<400> 10
 65 cuccccggcc gcuagggggc 20

<210> 11

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Desconocido

5 <220>
 <223> Oligonucleótido PS113 químicamente sintetizado

<400> 11
 gagccgctc agccgcacct c 21

10 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Desconocido

15 <220>
 <223> Oligonucleótido PS114 químicamente sintetizado

<400> 12
 20 gaagtcggcc acgtactgt c 21

<210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Desconocido

<220>
 <223> Oligonucleótido PS115 químicamente sintetizado

<400> 13
 30 ggagtcgaag acagttctag g 21

<210> 14
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Oligonucleótido PS116 químicamente sintetizado

<400> 14
 40 ggtacacagg actggagctg g 21

<210> 15
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 50 <223> Oligonucleótido PS142 químicamente sintetizado

<400> 15
 cagcagcagc agcagcagca g 21

<210> 16
 <211> 30
 <212> ARN
 <213> Desconocido

<220>
 60 <223> Oligonucleótido PS146 químicamente sintetizado

<400> 16
 65 cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 30

<210> 17

<211> 15
 <212> ARN
 <213> Desconocido

5 <220>
 <223> Oligonucleótido PS147 químicamente sintetizado

<400> 17
 cagcagcagc agcag 15

10 <210> 18
 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Desconocido

15 <220>
 <223> Oligonucleótido (CAG)n químicamente sintetizado

<400> 18
 cagcagcagc ag 12

20 <210> 19
 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Desconocido

25 <220>
 <223> Oligonucleótido (GCG)n químicamente sintetizado

30 <400> 19
 gcggcggcgg cg 12

<210> 20
 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Desconocido

35 <220>
 <223> Oligonucleótido (CUG)n químicamente sintetizado

40 <400> 20
 cugcugcugc ug 12

45 <210> 21
 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Desconocido

50 <220>
 <223> Oligonucleótido (CGG)n químicamente sintetizado

<400> 21
 cggcggcggc gg 12

55 <210> 22
 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Desconocido

60 <220>
 <223> Oligonucleótido (CCUG)n químicamente sintetizado

<400> 22
 ccugccugcc ug 12

65 <210> 23

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador 1 hDMPK
 <400> 23
 gggggatcac agaccatt 18
 10 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador 2 hDMPK
 <400> 24
 20 tcaatgcatc caaaacgtgg a 21
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de actina sentido
 30 <400> 25
 gctaygagct gcctgacgg 19
 <210> 26
 <211> 17
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador de actina antisentido
 40 <400> 26
 gaggccagga tggagcc 17
 <210> 27
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> cebador 1 Ptbp1
 <400> 27
 tctgtcccta atgtccatgg 20
 <210> 28
 <211> 19
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> cebador 2 Ptbp1
 <400> 28
 gccatctgca caagtcgct 19
 65 <210> 29

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador 1 Sindecán-3
 <400> 29
 gctgttgctg ccaccgct 18
 10 <210> 30
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador 2 Sindecán-3
 <400> 30
 20 ggcgcctcgg gactgcta 18
 <210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador 1 Taxilinbeta
 30 <400> 31
 ctcagccctg ctgcctgt 18
 <210> 32
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador 2 Taxilinbeta
 40 <400> 32
 cagaccata cgtgcttatg 20
 <210> 33
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> cebador 1 Huntington
 <400> 33
 gaaagtcagt ccggtagaa ctc 24
 55 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador 2 Huntington
 <400> 34
 65 cagatacccg ctccatagca a 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un oligonucleótido que consiste en una única cadena, con una longitud de 10 a 50 nucleótidos, que consiste en 2'-O-metil fosforotioato nucleótidos de ARN y que consiste en una secuencia que es complementaria sólo a un elemento repetitivo en un transcrito de gen tal y como se determina más abajo, para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno genético asociado a una inestabilidad de repetición de elementos cis en humanos tal y como se determina más abajo, **caracterizado por el hecho de que** dicho elemento repetitivo en un transcrito de gen se selecciona en el grupo que consiste en (CAG)_n y (CUG)_n:
- 10 - el oligonucleótido consiste en una secuencia que es complementaria a un tracto de poliglutamina (CAG)_n, donde el trastorno de inestabilidad de repetición es enfermedad de Huntington, ataxias espino-cerebelosas, síndrome de Haw River, atrofia muscular espinobulbar ligada al cromosoma X y/o atrofia dentatorubro-palidoluisiana,
- el oligonucleótido consiste en una secuencia que es complementaria a una repetición (CUG)_n, en el que el trastorno de inestabilidad de repetición es distrofia miotónica de tipo 1, ataxia espino-cerebelar 8 y/o enfermedad del Huntington de tipo 2.
- 15 2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** el oligonucleótido consiste en (CAG)₇ o (CUG)₇.
3. Oligonucleótido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para el uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno genético asociado a inestabilidad de repetición de elementos cis en humanos tal como determinado en la reivindicación 1.
4. Método *in vitro* para la reducción de repetición con transcritos de gen en una célula comprendiendo la administración de un oligonucleótido tal como definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

20

Fig 1

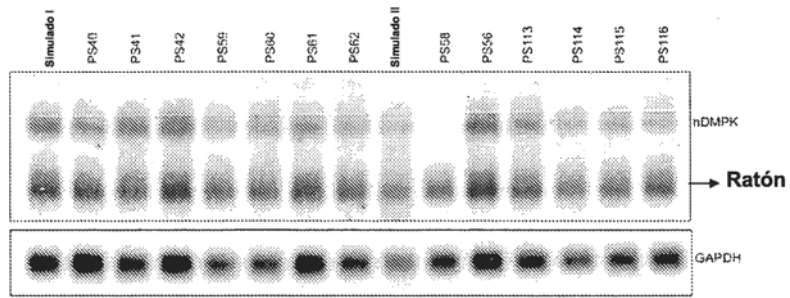


Fig 2

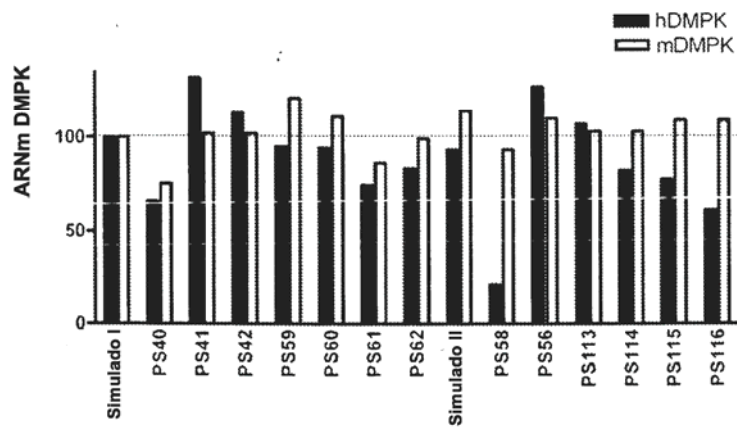


Fig 3

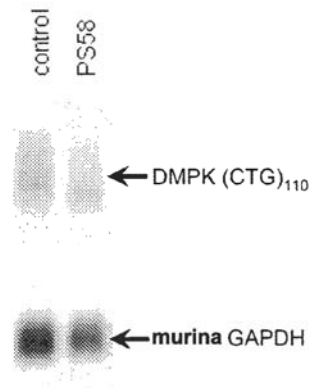


Fig 4

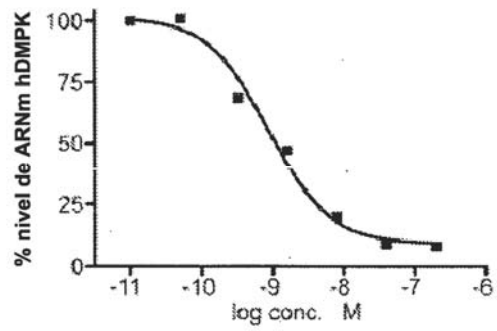


Fig 5

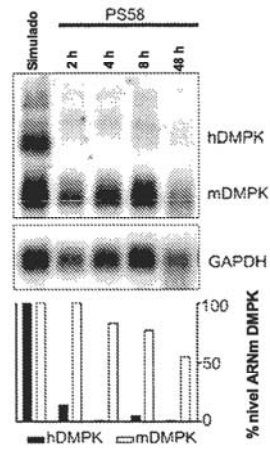


Fig 6

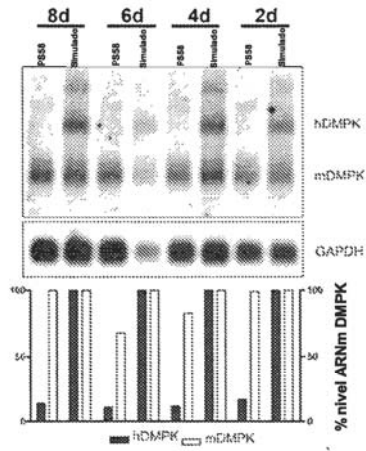


Fig 7

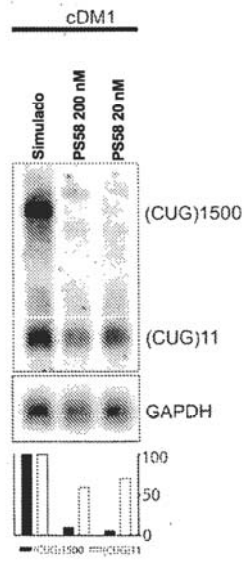


Fig 8

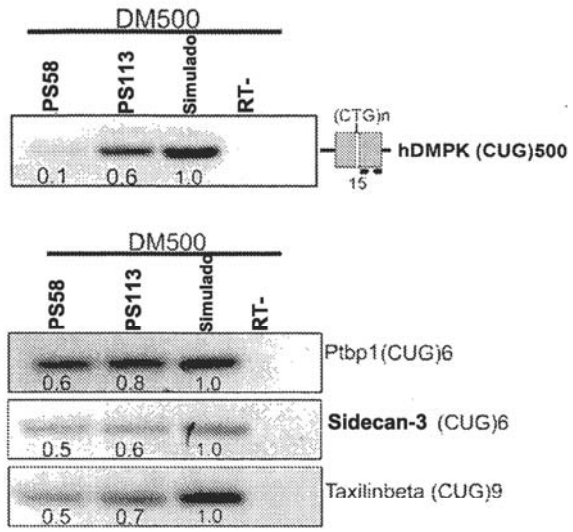


Fig 9

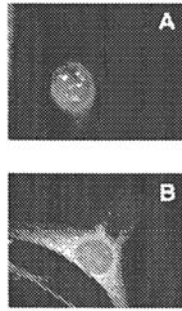


Fig 10

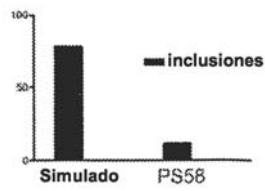


Fig 11

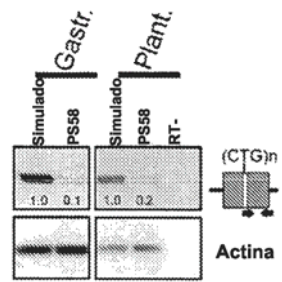


Fig 12

